

Melhoramento genético florestal e o desafio imposto pela doença da murchidão do pinheiro

Ana Filipa Duarte de Lemos Lisboa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais

Orientador: Maria Isabel Carrasquinho de Freitas

Arlindo Lima

Elsa Maria Félix Gonçalves

Júri:

Presidente: Doutor António Manuel Dorotêa Fabião, Professor Associado com Agregação do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Helena Reis de Noronha Ribeiro de Almeida, Professora Associada do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Maria Isabel Carrasquinho de Freitas, Investigadora Auxiliar do(a) Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, orientadora.

Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Isabel Carrasquinho por me ter permitido desenvolver este projeto. Sem o seu apoio e dedicação, tal não seria possível. Aprendi muito durante todo o processo e, em grande, parte devo-o a si.

Para a construção da análise estatística de todo este processo, agradeço à Prof.^a Elsa Gonçalves, minha coorientadora, sem a sua ajuda, ainda andaria aqui a tentar perceber alguma informação.

Agradeço também ao Professor Arlindo Lima, meu coorientador por toda a ajuda que me deu em relação à introdução teórica, bem como pelos conhecimentos transmitidos em relação à forma correta de redigir um trabalho científico.

À Doutora Lurdes Inácio, agradeço toda a ajuda que me deu através da correção do trabalho bem como pelas informações acerca das referências bibliográficas entre muitos outros cuidados.

À técnica superior Margarida Fontes, pela ajuda que me deu durante o processo de extração e contagem dos nemátodes.

Ao Doutor Luís Bonifácio, agradeço a tremenda ajuda que me deu na pesquisa bibliográfica. Sem essa, a fundamentação teria sido muito mais difícil de construir.

Aos Engenheiro Alexandre Aguiar e Engenheiro Ricardo Paiva, pela grande ajuda que me deram durante o processo de inoculação das plantas bem como durante o processo de avaliação e medição.

Aos meus colegas Marco Martins e David Gonçalves, pela ajuda que deram na organização do delineamento e no processo de inoculação. Foi uma boa maratona. A todos os outros colegas do INIAV que também ajudaram neste processo, nem que tenha sido apenas um tabuleiro, acreditem que foi uma boa ajuda.

Ao Marco Metelo, um grande obrigado por todo o apoio que me deste neste longo processo, desde a ajuda durante as medições até aos “nãos” que disseste aos mil e um planos que eu tinha, apesar de queres dizer que sim, ambos sabemos que se não o tivesses feito isto nunca mais acabava, bem como pelos “sermões” de responsabilidade quando me vias a desleixar. Principalmente, “Obrigada!” por não teres desistido de nós, por teres aturado o meu mau feitio e irritabilidade e por, apesar de tudo isto, nunca teres deixado de demonstrar o teu amor.

À Joana Baião, um obrigado muito especial por todo o apoio e por toda a insistência. Se não fosses tu, acho que não era desta e hoje ainda andava às turras com formatações e afins. Mas tu já sabes isto tudo.

A todos os meus colegas das turmas de licenciatura e de mestrado, em especial ao Afonso Pires, à Ana Lúcia Monteiro, ao Bruno Ferreira, à Filipa Maia, Gonçalo Luc e à Tatiana Valada, por, ao fim destes anos todos, me terem mostrado finalmente o que é fazer parte de uma turma. Vou ter saudades das horas de almoço em que não se aprendia nada.

Aos meus pais, por todo o apoio que me deram, não só durante o período deste trabalho, mas em todo o meu percurso escolar.

Ao Fábio Daniel, pelas tardes de *brainstorming* no “bunker”. Demos com a Joana em doida!

Resumo

O nemátode da madeira de pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* foi identificado em Portugal no ano de 1999 em *Pinus pinaster* causando a doença da murchidão do pinheiro. Esta espécie representa grande parte da floresta portuguesa, assumindo um papel importante impacto ambiental, social e económico nos ecossistemas onde se insere. Devido ao impacto que a doença da murchidão do pinheiro representa, foi iniciado em 2009 uma seleção fenotípica com vista ao estabelecimento de um programa de um programa de melhoramento genético dirigido ao combate da doença. Foram selecionadas cerca de 500 árvores de pinheiro bravo candidatas a “plus” numa área fortemente afetada pela doença, na zona de Comporta, distrito de Setúbal.

No âmbito do presente trabalho avaliaram-se parâmetros genéticos associados à sobrevivência de plantas de dois anos provenientes de 96 famílias de meios-irmãos dessa população, como resposta à inoculação artificial com *B. xylophilus* em estufa. Este ensaio foi estabelecido em estufa segundo um delineamento experimental de blocos casualizados completos. Para cada planta foi avaliada a altura total e o diâmetro na base. A sobrevivência foi calculada para cada família e foi avaliada em quatro datas após a inoculação: 27, 38, 56 e 157 dias. Para analisar os dados referentes às variáveis altura, diâmetro e sobrevivência foram ajustados modelos mistos.

Os resultados obtidos permitiram detetar variabilidade genética para a sobrevivência. Conclui-se que a sobrevivência é influenciada pela altura total da planta e pelo seu diâmetro da base do caule. Através da ordenação da percentagem média de sobrevivência estimada, foi possível identificar as famílias mais tolerantes/resistentes à Doença da Murchidão do Pinheiro.

Palavras-chave: *Pinus pinaster*, Nemátode da madeira do pinheiro; Ensaio de descendências; Parâmetros genéticos, Modelos mistos.

Abstract

The pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* was identified in Portugal, in 1999, in *Pinus pinaster*, causing the pine wilt disease. This species represents a major part of the Portuguese forest and it has an important role concerning environmental, social and economic impact over the many ecosystems.

A mass selection program was started in 2009 in a heavy affected area with the disease, at Comporta, Setúbal. About 500 pine trees were selected as candidates to plus trees. Two years old half-sib progenies obtained from 96 of those selected trees were inoculated with *B. xylophilus* in a greenhouse to evaluate their resistant/tolerance to pine wood disease, according to a randomized complete block design. Each plant was measured for the overall height and diameter at the base of the plant. The family survival was evaluated in four dates after the inoculation: 27, 38, 56 and 157 days. Mixed models were used to analyze data referring to height, diameter and survival.

The results allowed detecting genetic variability for survival. It was concluded that survival is influenced by the overall height and diameter of the stem base. By ordering the average percentage of estimated survival, it was possible to identify resistant/tolerant families to Pine Wilt Disease.

Keywords: *Pinus pinaster* Ait., Pine wood nematode, Progeny test, Genetic parameters, mixed models.

Índice

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A doença da murchidão do pinheiro.....	1
1.1.1	O nemátode da madeira do pinheiro <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	1
1.1.2	O inseto vetor.....	3
1.1.3	Hospedeiros suscetíveis	4
1.2	A distribuição do nemátode da madeira do pinheiro no mundo	6
1.2.1	O nemátode da madeira do pinheiro na América do Norte.....	6
1.2.2	O nemátode da madeira do pinheiro no Japão e outros países Asiáticos.....	7
1.2.3	O nemátode da madeira do pinheiro na Europa	8
1.3	Medidas de gestão para a doença da murchidão do pinheiro	9
1.3.1	As medidas de controlo aplicadas em Portugal	12
1.4	Objetivos do trabalho	16
2	MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1	Material vegetal	17
2.2	Agente patogénico	17
2.3	Metodologias aplicadas	17
2.3.1	Delineamento experimental.....	17
2.3.2	Técnica de inoculação das plantas.....	19
2.3.3	Variáveis estudadas	20
2.4	Análise Estatística.....	21
2.4.1	Variáveis Altura, Diâmetro e Sobrevivência.....	21
2.4.2	Variável Número de nemátodes extraídos.....	24
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1	Avaliação da variabilidade das famílias	26
3.2	Avaliação do número de nemátodes extraídos.....	32
4	CONCLUSÃO.....	34
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

6	Anexos	40
	Anexo I: Distribuição das 96 famílias pelos quatro blocos, na estufa	40
	Anexo II: Ordenação (Ord.) decrescente dos melhores preditores lineares não enviesados empíricos (EBLUP) dos efeitos da família para as variáveis altura (cm) e diâmetro (mm).41	
	Anexo III: Ordenação dos melhores preditores lineares não enviesados empíricos (EBLUPS) dos efeitos da família relativamente à sobrevivência (escala <i>logit</i>), para as quatro avaliações realizadas após a inoculação.	42
	Anexo IV: Ordenação da percentagem de sobrevivência estimada ($\pi.j$) para as quatro avaliações realizadas após a inoculação.	44

Índice de Quadros

Quadro 1: Estimativas das componentes de variância das famílias (σ_{Fam}^2) e do erro (σ_e^2), da média, do máximo e do mínimo, para as variáveis altura e diâmetro.....	26
Quadro 2: Ordenação decrescente do melhor preditor linear não enviesado empírico (EBLUP) dos efeitos da família para as variáveis altura e diâmetro para 24 das 96 famílias estudadas	26
Quadro 3: Estimativas da componente de variância das famílias (σ_{Fam}^2) relativa à sobrevivência e dos coeficientes associados à altura (β_1) e ao diâmetro (β_2), resultantes do ajustamento do modelo <i>logit</i> aos dados obtidos nas quatro datas de observação após a inoculação (DAI).....	27
Quadro 4: Estimativas das componentes de variância das famílias (σ_{Fam}^2) e do erro (σ_e^2), resultantes do ajustamento do modelo <i>probit</i> aos dados obtidos aos 157 dias após a inoculação	28
Quadro 5: Ordenação dos melhores preditores lineares não enviesados empíricos (EBLUPS) dos efeitos da família relativamente à sobrevivência (escala <i>logit</i>), e correspondente percentagem de sobrevivência estimada ($\hat{\pi}_{.j}$) para 23 das 96 famílias, nas quatro datas observadas após a inoculação (DAI)	30
Quadro 6: Ordenação da percentagem de sobrevivência estimada ($\hat{\pi}_{.j}$) e correspondentes melhores preditores lineares não enviesados empíricos (EBLUPS) dos efeitos da família relativamente à sobrevivência (escala <i>logit</i>) para 23 das 96 famílias, nas quatro datas observadas após a inoculação (DAI)	31

Índice de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> associado ao de <i>Monochamus galloprovincialis</i>	2
Figura 2: Distribuição mundial e respetivo ano de deteção do nemátode da madeira do pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	9
Figura 3: Freguesias classificadas como zonas de intervenção em 2015 (Esquerda); Freguesias classificadas como ZT em 2012 (Direita).	14
Figura 4: Esquema do delineamento experimental aplicado no ensaio de inoculação em estufa.	18
Figura 5: Evolução mensal das temperaturas média, máxima e mínima do ar e da humidade relativa média do ar na estufa correspondente ao período de duração do ensaio.	18
Figura 6: Processo de inoculação.....	19
Figura 7: Vários estados de sintomatologia das plantas. A e B: planta viva; C: planta morta.	20
Figura 8: Percentagem de sobrevivência média (π ..), estimada algumas famílias nas quatro datas de observação após a inoculação (DAI).	32
Figura 9: Distribuição do número de nemátodes por família	32

Lista de abreviaturas

ASAE: Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

DAI: Dias Após a Inoculação

DAP: Diâmetro à Altura do Peito

DMP: Doença da Murchidão do Pinheiro

EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization

GCA: General Combining Ability (Capacidade Geral de Combinação)

GNR: Guarda Nacional Republicana

HdC: Herdade da Comporta

ICNF: Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

IFN: Inventário Florestal Nacional

INIAV: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

IPMA: instituto português do mar e da atmosfera

MNE: Mata Nacional do Escaroupim

NMP: Nemátode da madeira do Pinheiro

PANCNMP: Plano de Ação Nacional para Controlo do Nemátode da Madeira do Pinheiro

PROLUMP: Programa Nacional de Luta Contra o Nemátode da Madeira do Pinheiro

SEPNA: Serviço de Proteção da Natureza e do Ambiente

PCPS: Pomar clonal de produção de semente

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença da murchidão do pinheiro

A doença da murchidão do pinheiro (DMP) é causada por *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer), nemátode da madeira do pinheiro (NMP), que, por sua vez, é vetorizado por um inseto do género *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) até às espécies de coníferas hospedeiras. O triângulo da doença é então composto pelo agente causal, o inseto vetor e o hospedeiro. Os sintomas mais evidentes são a murchidão súbita da árvore e a cessação de produção de resina que surgem como resposta à infeção, dado a transpiração das folhas diminuir, acabando mesmo por parar. Quando o processo de transpiração cessa, verifica-se uma descoloração das agulhas, adquirindo um tom avermelhado (Tóth, 2011). Os canais de transporte de fluídos acabam por ficar entupidos e a árvore morre devido à cavitação, num curto período de tempo que pode variar entre um a três meses após o aparecimento dos primeiros sintomas (Kuroda, 1991; Akbulut & Stamps, 2012). Contudo, estes sintomas podem vir a ser confundidos com outros causados por diferentes fatores bióticos e abióticos, sendo que a identificação da DMP apenas é possível em laboratório (Tóth, 2011).

A introdução do NMP em novos locais pode ser causada, a curtas distâncias, pelas deslocações dos insetos vetores, mas no que diz respeito a grandes distâncias é o homem o principal responsável, através das suas trocas globais. As exportações de madeiras, dos seus produtos derivados ou até as embalagens de madeira utilizadas para o transporte de outro tipo de bens, são a principal forma de transmissão do nemátode e do seu inseto vetor. Existem casos de nemátodes encontrados em embalagens importadas de locais onde este não existia, mas devido ao uso repetido e recirculação da madeira, esta acabou por ficar contaminada, o que faz com que os portos e locais de acumulação de madeira sejam potenciais focos da doença (Mota *et al.*, 2009).

1.1.1 O nemátode da madeira do pinheiro *Bursaphelenchus xylophilus*

O género *Bursaphelenchus* é composto por cerca de 100 espécies que se dividem em seis grupos: *xylophilus*, *hunti*, *aberrans*, *eidmanni*, *borealis* e *piniperdae* (Ryss *et al.*, 2005). Segundo Mota *et al.* (2009) existem 10 espécies deste género associadas ao pinheiro bravo em Portugal. Porém, *B. xylophilus* é a única espécie do género a integrar a lista de organismos de quarentena da European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP), (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2013) devido ao facto de ser o agente causal da DMP desde 1985 (Shin *et al.*, 2009; Tóth, 2011). Os nemátodes são organismos dependentes de água, contudo, *B. xylophilus* é capaz de se mover da madeira para o vetor e vice-versa (Evans *et al.*, 1996).

O ciclo de vida de *B. xylophilus* (Fig. 1) é complexo e está associado ao do seu inseto vetor, podendo ser transmitido ao hospedeiro em duas fases distintas do ciclo de vida do inseto vetor: na fase micófaga (em que o nemátode é transmitido durante a oviposição em árvores em declínio ou mortas) e na fase fitófaga (em que o nemátode é transmitido durante do pasto de maturação) (Naves *et al.*, 2007a; Fonseca *et al.*, 2013).

Assim que os nemátodes entram no hospedeiro, transformam-se em adultos, alimentam-se, acasalam e iniciam a postura. Esta fase de propagação é rápida e a taxa de distribuição dos nemátodes na árvore depende da suscetibilidade do hospedeiro e principalmente da temperatura ambiente (Fonseca *et al.*, 2013). Algum tempo após a invasão inicial, os nemátodes podem deixar de se multiplicar e as populações começam a diminuir, especialmente quando a disponibilidade de alimento começa a ficar reduzida ou quando as temperaturas médias diminuem. Nesta altura de carência, formam-se os nemátodes de terceiro estágio juvenil de resistência (JIII), representado na Figura 1 por DL3, diferente do terceiro estágio normal dada a sua capacidade de suportar as condições adversas. Pensa-se que estes juvenis, atraídos por compostos químicos emitidos pelas pupas do inseto vetor se acumulam junto das imediações da câmara pupal e quando os insetos emitem novos compostos químicos, próximo da altura de emergir, formam-se os nemátodes de quarto estágio especializados para serem transportados pelo inseto vetor, denominados juvenis *dauer* (JIV), DL4 na Figura 1 (Zhao *et al.*, 2014).

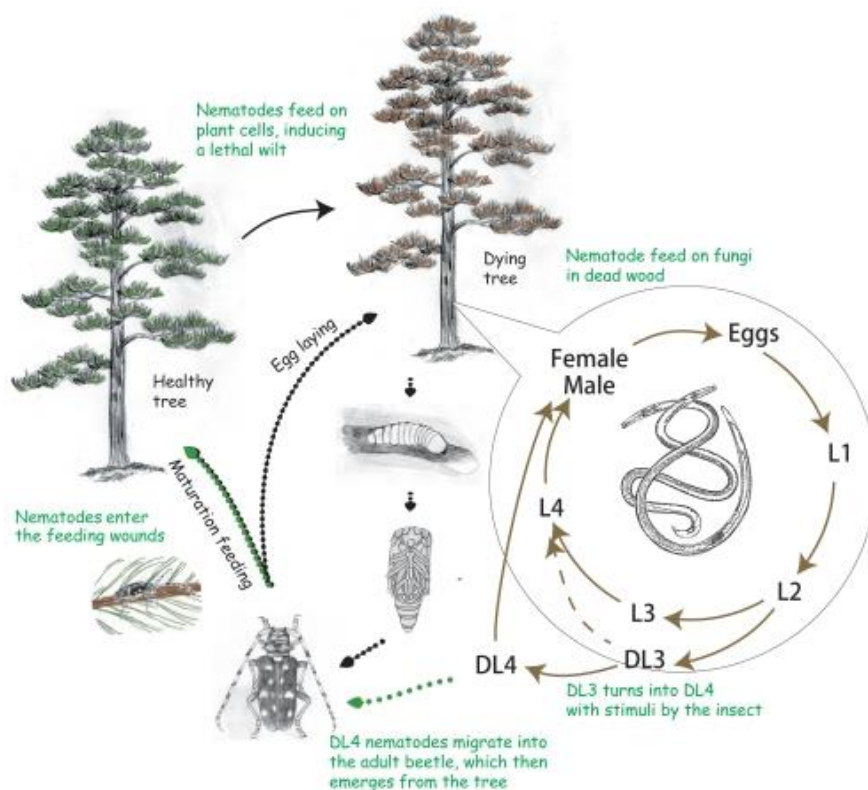


Figura 1: Ciclo de vida de *Bursaphelenchus xylophilus* associado ao de *Monochamus galloprovincialis*. Fonte: <http://krauthammerlab.med.yale.edu/>

Quando os insetos adultos jovens emergem das árvores onde se desenvolveram, procuram árvores saudáveis para iniciar o pasto de maturação, altura em que podem transmitir os nemátodes. Sob determinadas condições climáticas, com uma temperatura favorável de 25°C, o nemátode pode multiplicar-se rapidamente numa árvore suscetível sendo que uma geração pode completar-se entre 4 a 6 dias. Nesta fase, os nemátodes alimentam-se dos tecidos da planta, mais propriamente das células do parênquima existentes nos canais de resina e movem-se do câmbio para o xilema, bloqueando a condução de água (cavitação) (Mota *et al.*, 2009; Tóth, 2011; Akbulut & Stamps, 2012). Quando não se verificam as condições favoráveis ao desenvolvimento do nemátode a infeção não atinge a fase sistémica, isto é, a infeção estabelecida na copa não se dissemina (Tóth, 2011).

As árvores mortas ou fragilizadas são potenciais alvos para as fêmeas do inseto vetor realizarem a oviposição, iniciando assim um novo ciclo e aumentando o número de nemátodes dado que estes se conseguem multiplicar tanto na fase micófaga como na fase fitófaga (Mota *et al.*, 2009).

Os nemátodes podem ser encontrados em toda a árvore, exceto nas raízes, agulhas, pinhas e sementes e quando as condições climáticas o permitem podem manter-se nas árvores cerca de três anos após a morte do hospedeiro. Por outro lado, os nemátodes podem ser encontrados nas pilhas de madeira ou em produtos produzidos com esta matéria-prima, sendo este um dos principais mecanismos de transmissão a longas distâncias (Mamiya, 1998; Tóth, 2011). De facto, no Japão têm sido capturados insetos vetores e nemátodes nas pilhas de madeira acumulada nas fábricas de pasta que se situam nas imediações de florestas afetadas (Mamiya, 1998).

1.1.2 O inseto vetor

Como já foi referido, o NMP é vetorizado por insetos do género *Monochamus*, existindo várias espécies em todo o mundo. Na América estas encontram-se distribuídas por todo o continente, sendo que *M. carolinensis* Olivier, *M. clamator* LeConte e *M. rubigenus* Bates, são algumas das espécies que atuam como possíveis vetores de *B. xylophilus* nas regiões da América do Norte e/ou da América Central, sendo *M. carolinensis* o mais importante (Naves *et al.*, 2013). O mesmo acontece no continente asiático onde, por exemplo, estão presentes nas zonas afetadas pelo NMP as espécies *M. alternatus* Hope, *M. grandis* Waterhouse, *M. nitens* Bates e *M. saltuarius* Eschscholz, sendo *M. alternatus* o mais importante (Naves *et al.*, 2013). Na Europa podem-se encontrar três espécies, sendo que *M. galloprovincialis* (Olivier) é a única que se encontra em Portugal (Evans *et al.*, 1996; Akbulut & Stamps, 2012).

Os insetos adultos de *M. galloprovincialis*, recém-emergidos, necessitam de efetuar um pasto de maturação em raminhos jovens, do próprio ano ou do anterior, para terminarem o seu

desenvolvimento e maturação sexual, bem como para acumularem energias para o acasalamento e, no caso das fêmeas, para a postura (Evans *et al.*, 1996). Em Portugal, o período de emergência ocorre de maio a setembro, passando por um pico nos meses de julho e agosto (Naves & Sousa, 2008). Durante cerca de 15 a 20 dias após a emergência (Naves *et al.*, 2006), os insetos efetuam o pasto de maturação, voando de árvore em árvore e causando pequenas feridas nos raminhos da copa. É através destas feridas que transmitem o nemátode para a árvore, quando o transportam no interior das suas traqueias (Fonseca *et al.*, 2013).

Após esta fase, os insetos iniciam o período de voo e acasalamento. A distância percorrida está relacionada com a proximidade de árvores saudáveis e com a direção dominante do vento. Num ensaio foram colocados em pinheiros, insetos após a maturação sexual, verificando-se que um terço ficou na mesma árvore em que foi colocado e que os restantes se deslocaram em média 5 m no caso dos machos e 4 m no caso das fêmeas (Evans *et al.*, 1996; Bonifácio *et al.*, 2013).

O acasalamento ocorre geralmente no tronco das árvores em declínio ou mortas e em troncos acabados de cortar, enquanto a fêmea escava uma cavidade na casca para proceder à oviposição. Esta fase pode durar todo o tempo de vida da fêmea, acasalando sucessivamente com vários parceiros e depositando um ou mais ovos, em cada cavidade até morrer, no entanto, existem algumas cavidades que podem ficar vazias (Naves, *et al.*, 2013). O período em que as árvores são adequadas para a oviposição e desenvolvimento do ovo e larva é relativamente curto. Após o abate, as árvores mantêm-se adequadas durante 30-80 dias, consoante as condições ambientais, sobretudo a temperatura (Evans *et al.*, 1996).

Os ovos eclodem entre 6-11 dias após a postura, conforme a temperatura e, quando saem, as larvas do primeiro instar começam a alimentar-se do floema e do câmbio na zona subcortical. Quando as larvas atingem o terceiro instar migram para o cerne e no quarto instar formam uma galeria pupal (Naves *et al.*, 2013). As larvas de *M. galloprovincialis* levam 10-13 meses a completar o seu desenvolvimento, passando por uma fase de diapausa obrigatória durante os meses de inverno, coincidindo geralmente com o último instar, tendo apenas uma geração anual (Naves *et al.*, 2007b; Naves *et al.*, 2008). A fase de pupa pode durar até 19 dias e, após esta fase, os jovens insetos começam a escavar para o xilema até emergirem da árvore, iniciando assim um novo ciclo de vida. Entre a eclosão do inseto e a saída da árvore podem decorrer 6-8 dias (Akbulut & Stamps, 2012).

1.1.3 Hospedeiros suscetíveis

Os insetos do género *Monochamus* preferem essencialmente pinheiros, podendo todavia atacar píceas e abetos, entre outras espécies de coníferas, sendo a *Thuja plicata* Donn ex D. Don in Lambert, uma das espécies que não é afetada por este inseto (Tóth, 2011). Este facto,

conjugado com a ocorrência de várias espécies de coníferas hospedeiras com diferentes graus de suscetibilidade ao NMP, em especial as do género *Pinus*, nos três continentes onde a DMP já foi identificada, leva a que o seu risco de introdução em novos países seja muito elevado. Na América, o NMP não causa a DMP nas espécies de coníferas nativas, ameaçando apenas as espécies exóticas. Isto pode dever-se a um processo de coevolução determinando o aparecimento de resistência natural nas espécies de árvores nativas (Sutherland, 2008). De acordo com Evans *et al.* (1996), na América do Norte as espécies exóticas de *Pinus* apresentam normalmente suscetibilidade intermédia, como por exemplo *P. banksiana* Lambert e *P. contorta* Douglas ex Loudon. Porém, na América Central existem três espécies suscetíveis, *P. ayacahuite* Ehrenberg ex Schlechtendahl, *P. leiophylla* Schiede ex Schlechtendal et Chamisso, *P. muricata* D. Don bem como algumas de suscetibilidade intermédia. No que diz respeito a outras coníferas, podemos considerar como possíveis hospedeiros *Abies amabilis* Douglas ex J. Forbes, *Larix laricina* (DuRoi) K. Koch, *Picea engelmannii* Parry ex Engelmann entre outras. No continente asiático, *P. densiflora* Siebold et Zuccarini e *P. thunbergii* Parlatore são duas das espécies de *Pinus* que apresentam suscetibilidade à DMP, existindo também outras coníferas suscetíveis, como é o caso de *Abies firma* Siebold et Zuccarini e *Picea jezoensis* (Siebold et Zuccarini) Carrière (Evans *et al.*, 1996). Em relação ao continente europeu, segundo Evans *et al.* (1996), no género *Pinus* as espécies, *P. mugo* Turra, *P. nigra* J. F. Arnold, *P. pinaster* Aiton e *P. silvestres* Linnaeus são espécies suscetíveis ao NMP, enquanto que *P. halepensis* subsp. *Halepensis* Miller, *P. halepensis* subsp. *brutia* (Tenore) Holmboe, e *P. pinea* Linnaeus apresentam uma suscetibilidade intermédia. Em relação a outras coníferas, espécies do género *Cedrus*, das quais *C. atlântica* (Endl.) G. Manetti ex Carrière, *C. deodara* (Roxb. ex D. Don) G. Don, *Larix decídua* Mill. e *Picea abies* (Linnaeus) Karsten também são possíveis hospedeiros do NMP.

Em Portugal, o pinheiro bravo (*P. pinaster*) parece ser o hospedeiro mais suscetível à DMP (Naves *et al.*, 2006) ainda que recentemente também tenha sido detetada em *P. nigra* (Inácio *et al.*, 2015). O pinheiro bravo ocupa uma área de 714 mil ha, o que corresponde a 23% dos 35% do território ocupado por florestas, tendo-se perdido em relação ao inventário anterior (2005) cerca de 263 mil há (ICNF, 2013). Esta redução de área é devida em parte às medidas de controlo e aos efeitos da DMP bem como aos incêndios florestais (ICNF, 2013). A sua importância económica para a sociedade é muito relevante dadas as várias utilizações que esta espécie tem, tais como a sustentação de terras e dunas, produção de pasta para papel e resina e principalmente a fileira industrial da madeira e do pinheiro em si, entre outras atividades indiretas como a produção de cogumelos, a apicultura e a caça. A DMP veio afetar, ao restringir a comercialização dentro e fora do país, toda a fileira da madeira de pinho bravo

e dos produtos associados através do estabelecimento de legislação restritiva (ver §1.3.1) (Figueiredo *et al.*, 2014).

A importância económica desta espécie justificou que fosse iniciado, nos anos 60, um programa de melhoramento dirigido ao volume e forma da árvore. Para tal foi realizada, na Mata Nacional de Leiria, uma seleção fenotípica para as características altura total, diâmetro à altura do peito (DAP), forma do tronco, fio espiralado, vigor e forma da copa, de onde resultaram 85 árvores “plus”. Esta seleção foi realizada por um técnico Australiano, D. H. Perry (Perry & Hopkins, 1967), em parceria com alguns investigadores portugueses, pioneiros no melhoramento florestal. Após a seleção destes indivíduos foram estabelecidos, na Mata Nacional do Escaroupim (MNE), dois pomares clonais produtores de semente (PCPS), onde atualmente se encontram representadas 60 das 85 árvores selecionadas constituindo a população de produção. Essa população tem como objetivo fornecer material florestal de reprodução de qualidade genética superior para o estabelecimento de novos povoamentos destinados a produção de madeira para a indústria da serração. Através de projetos de investigação nacionais e internacionais, ao longo dos anos, desde 1987, a base genética tem vindo a aumentar, existindo atualmente quatro populações de melhoramento distintas (Aguar *et al.*, 2011)

O pinheiro bravo é também afetado por outras pragas que indiretamente podem influenciar a DMP, como por exemplo os escolitídeos como *Ips sexdentatus* (Börner, 1776), *Orthotomicus erosus* (Wollaston), *Tomicus piniperda* (Linnaeus) e *T. destruens* Wollaston. Estes escolitídeos alimentam-se da casca do pinheiro, formando galerias no seu interior e, independentemente da intensidade do ataque, podem estabelecer associações com fungos patogénicos que poderão servir de alimento ao NMP na sua fase micófaga. Por outro lado, pode ocorrer também interação destes insetos com bactérias que têm a capacidade de facilitar o desenvolvimento de fungos, através da quebra das barreiras naturais de defesa dos hospedeiros (Vasconcelos & Duarte, 2013).

1.2 A distribuição do nemátode da madeira do pinheiro no mundo

1.2.1 O nemátode da madeira do pinheiro na América do Norte

O nemátode *B. xylophilus* foi identificado pela primeira vez nos EUA em 1934 associado a um fungo da madeira, contudo só em 1979 foi relacionado à DMP. Após a sua associação à doença, foram realizadas prospeções nas quais se determinou que é originário da América do Norte, onde está distribuído pelos Estados Unidos da América e pelo Canadá, existindo uma observação no México (Sutherland, 2008; Cram & Hanson, S/data).

1.2.2 O nemátode da madeira do pinheiro no Japão e outros países Asiáticos

Desde 1905, que a DMP está presente no Japão, onde foram observados pela primeira vez os seus sintomas, em Nagasaki, na ilha de Kyushu, afetando as florestas de *P. densiflora* e *P. thunbergii*. Estas espécies exerciam um papel importante para as comunidades locais dado serem as únicas capazes de se desenvolver em terrenos inférteis e nas orlas costeiras (Toda & Kurinobu, 1999). Nessa época, a doença não foi considerada epidémica, nem se conhecia o seu agente causal, atuando-se através do abate e descasque das árvores mortas. Em 1921, foi detetada em florestas próximas de mais dois portos e foi-se alastrando progressivamente para o interior. Nos anos 40, a doença teve uma grande expansão, não só para as zonas adjacentes às já afetadas, mas também para novas zonas, mais remotas. Durante a Segunda Guerra Mundial, as florestas foram deixadas ao abandono, não havendo manutenção e cortes das árvores mortas uma vez que muitas das áreas florestais afetadas se encontravam junto dos portos que estavam sob domínio militar (Mota *et al.*, 2009).

Após o fim da guerra, iniciou-se uma inspeção nas florestas afetadas e foi elaborado um relatório, onde foram propostas novas medidas com o objetivo de diminuir os danos causado pela doença e descobrir qual o seu agente causal (Furniss, 1950; Furniss, 1951). Nesta altura, pensava-se que a morte dos pinheiros fosse causada por insetos subcorticais, adotando-se medidas contra essa praga. Estas medidas levaram a uma redução dos danos, mas a mudança do estilo de vida da população no fim dos anos 50, ao deixar de utilizar as florestas e os seus recursos como combustível, levou à acumulação de resíduos nos solos provocando a sua eutrofização e consequentemente a uma fragilização das árvores (Furniss, 1950; Furniss, 1951).

Nos anos 60, foi implementado um novo projeto de investigação onde se descobriu que os insetos, que supostamente seriam os causadores da doença, não podiam pôr os seus ovos em árvores saudáveis e que os sintomas de exsudação de resina surgiam antes dos seus ataques. A partir deste ponto, os “alvos” de investigação foram ampliados a fatores desconhecidos, tais como microrganismos, fatores edáficos, fatores meteorológicos, entre outros. Em 1968, Tokushige identificou nemátodes da família *Bursaphelenchus* em árvores afetadas e através de testes de inoculação, confirmou a sua patogenicidade para os pinheiros (Tokushige & Kiyohara, 1969). Ai, procedeu-se a uma busca do inseto vetor e *M. alternatus* foi considerado o único inseto capaz de transferir o nemátode das árvores mortas para as árvores vivas. Ao determinar o agente causal da doença e o seu inseto vetor, foi então possível determinar o ciclo completo da infeção da DMP. Nesta altura e apesar das inúmeras medidas de controlo aplicadas, o NMP já estava espalhado por todo o país, com exceção de duas regiões situadas nas regiões mais a norte (Mota *et al.*, 2009).

Nos anos 80, o nemátode foi encontrado em outros países asiáticos. Em 1982, foi detetado pela primeira vez na China, associado a *P. thumbergii*, sendo que mais tarde foi também registado em *P. massoniana* Lambert (Nose & Shiraishi, 2008). Em 1985, na Tailândia, foi assinalado em *P. luchuensis* Mayr e em 1989 na Coreia, também associado às espécies japonesas *P. thumbergii* e *P. densiflora* (Mota *et al.*, 2009).

1.2.3 O nemátode da madeira do pinheiro na Europa

Desde 1994 Portugal foi considerado como um país de risco relativamente à DMP, dada a presença de espécies florestais suscetíveis, nomeadamente pinheiros. (Mota *et al.*, 1999). Em resposta a um alerta lançado pela Direção Geral de Proteção de Culturas foi então iniciado, em 1996, um programa de vigilância ao nemátode e aos cerambicídeos, insetos vetores da doença, por todo o país. Em consequência deste programa nacional, o nemátode foi identificado pela primeira vez em 1999, em pinheiro bravo, nas regiões de Pegões e Marateca, perto do porto marítimo de Setúbal (Mota *et al.*, 1999; Mota *et al.*, 2009). Atualmente, os estudos de similaridades genéticas indicam que este nemátode foi introduzido através de material proveniente da Ásia (Mota *et al.*, 2009; Valadas *et al.*, 2012).

Após a introdução do nemátode em Portugal e da identificação de *M. galloprovincialis* como inseto vetor, foram iniciados estudos sobre a distribuição deste inseto e de outros potenciais insetos vetores presentes na Europa, incluindo em Espanha, já que, também neste país, o pinheiro bravo é uma das principais espécies florestais. Nestes países, existe um risco natural de dispersão, quer pelo transporte de madeira, quer pelo voo natural do inseto, o que combinado com as condições climáticas destes, propícias ao desenvolvimento do NMP, tornam o risco de estabelecimento da doença muito elevado. Em 2008, foi identificada em Espanha uma amostra positiva para *B. xylophilus*, recolhida a 20 Km da fronteira portuguesa o que levou à tomada de medidas preventivas. Posteriormente, em 2010, foi encontrado um novo foco a 10 km da fronteira (Robertson *et al.*, 2011).

Para além de Portugal continental, o NMP foi também detetado na Ilha da Madeira em 2009. As condições climáticas da ilha, associadas à presença do inseto vetor e de uma considerável área de pinheiro bravo, são também favoráveis à progressão da DMP. Após a deteção, foram realizadas novas prospeções em várias áreas da Ilha da Madeira e de Porto Santo, recolhendo amostras de madeira de vários locais e analisando-as em laboratório. Das 500 amostras recolhidas, 22,8 % acusaram a presença do NMP (Fonseca *et al.*, 2012).

A distribuição mundial da doença encontra-se esquematizada na Figura 2.

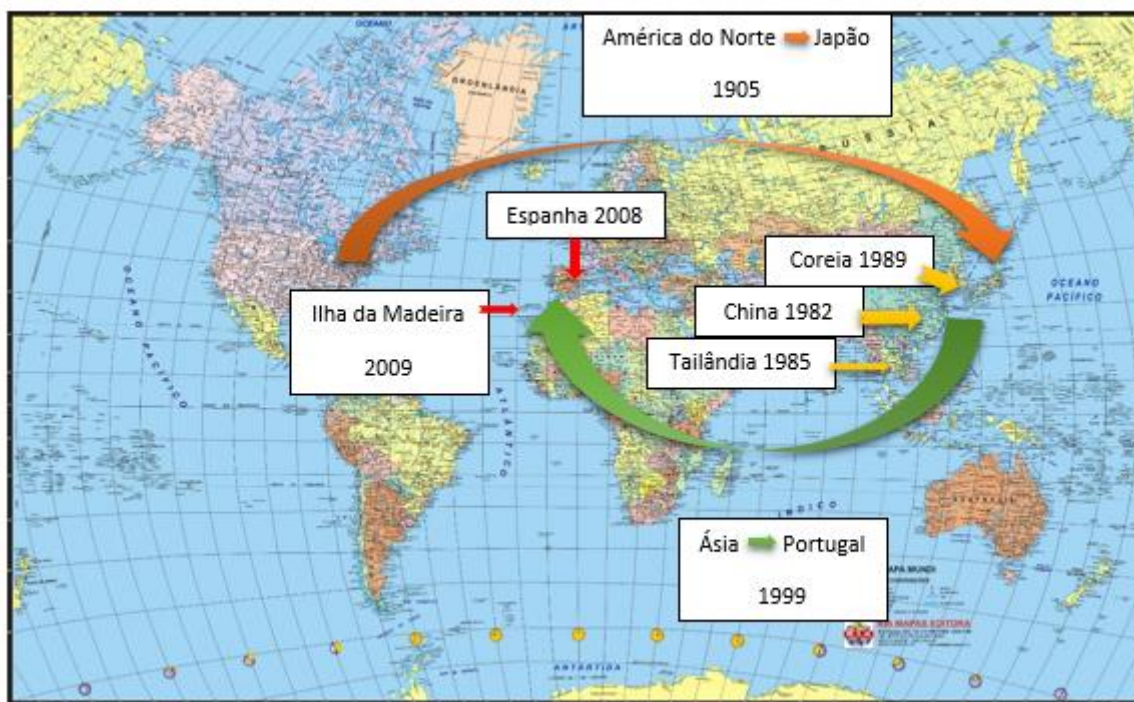


Figura 2: Distribuição mundial e respetivo ano de deteção do nemátode da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*.

1.3 Medidas de gestão para a doença da murchidão do pinheiro

Existem várias estratégias de controlo da DMP com efeitos a curto, médio e longo prazo, que podem atuar em cada um dos vértices do triângulo da doença, nomeadamente no que respeita ao agente patogénico, ao inseto vetor e ao hospedeiro. As medidas culturais e mecânicas, as mais comuns, caracterizam-se por serem mais abrangentes, pois são dirigidas para os vários componentes da DMP. Correspondem ao abate das árvores infetadas e respetivo tratamento, onde também são incluídos os planos de gestão e ordenamento florestal. As estratégias químicas correspondem à aplicação de nematicidas e de inseticidas no interior ou superfície dos hospedeiros. Já as biotécnicas referem-se à introdução de armadilhas de captura do inseto vetor, compostas por substâncias que alteram o seu comportamento. Este método é geralmente eficaz e tem a particularidade de não causar grandes impactos ambientais. Em relação às estratégias biológicas, estas caracterizam-se pelo controlo biológico do nemátode ou do seu inseto vetor, através da utilização de inimigos naturais de cada um (Sousa *et al.*, 2013).

Na América do Norte, devido ao facto de a doença não afetar as espécies nativas, as medidas de controlo estão relacionadas com as espécies de coníferas exóticas cuja suscetibilidade da doença é elevada, evitando-se a sua introdução em regiões cujas temperaturas de verão sejam elevadas. Quando as espécies já se encontram presentes, procede-se ao seu corte

apenas no caso de estarem afetadas pela DMP, de modo a restringir a doença (Cram & Hanson, S/data).

Após a descoberta do agente causal da DMP, no Japão, algumas medidas de controlo culturais mais tradicionais, como sejam o abate e queima de árvores mortas e/ou sintomáticas, que já vinham a ser aplicadas desde o início do século, foram reforçadas com ações dirigidas ao nemátode e ao seu vetor, nomeadamente a aplicação de caldas inseticidas em árvores vivas, para impedir os insetos de efetuar o seu pasto de maturação (Mota *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 1996). A sua aplicação por via aérea gerou alguma polémica na sociedade civil e na comunidade científica, por receio das repercussões ambientais que daí pudessem advir. Perante os protestos, a dose de inseticida foi reduzida bem como as áreas e os períodos em que este era aplicado. Esta medida mostrou-se ineficaz pois deu margem a novos ataques de insetos após a diminuição do volume de inseticida aplicado. Por outro lado, este meio de luta nada fazia para melhorar as árvores assintomáticas e aquelas que já tinham sido afetadas (Mota *et al.*, 2009). Houve, ainda, uma tentativa de utilização de outras medidas químicas, como seja a aplicação de nematicidas, mas esta teve um sucesso limitado dado o risco potencial de fitotoxicidade (Evans *et al.*, 1996).

Uma das medidas de controlo utilizada na gestão de uma doença ou praga florestal pode passar pela utilização de árvores geneticamente resistentes/tolerantes a essa ameaça, selecionadas através dos programas de melhoramento genético (Telford *et al.*, 2015). Snieszko (2006) refere que um fator chave para determinar o futuro de uma espécie afetada é a frequência e os tipos de resistência genética naturalmente presentes. Em termos globais, num programa de melhoramento genético procede-se à realização de três passos fundamentais que funcionam de forma cíclica: 1) seleção de árvores “plus”; 2) mobilização para pomares de sementes ou parques clonais e 3) avaliação e seleção de novos indivíduos em ensaios de descendência ou em testes clonais (Ohba, 1979; Zobel & Talbert, 1984; Eriksson *et al.*, 2006). Assim, a seleção fenotípica corresponde ao primeiro passo de um programa melhoramento e deve ser realizada de acordo com os critérios desejados, em locais diversos, de forma a garantir a diversidade genética.

No Japão, o método de controlo da DMP através do estabelecimento de um programa de melhoramento genético foi iniciado em 1978 na zona sudoeste, quer em *P. densiflora* quer em *P. thunbergii*, através de uma seleção fenotípica de árvores aparentemente saudáveis, em zonas muito afetadas pela doença, cuja sobrevivência rondava menos de 10%. Estes indivíduos foram reproduzidos por enxertia, para serem usados em testes artificiais de inoculação com nemátode (Ohba, 1979). A seleção decorreu durante três anos em povoamentos adultos abaixo dos 400 metros de altitude. Foram identificadas como candidatas

a “plus” 11466 árvores de *P. densiflora* e 14620 de *P. thunbergii*. Os ensaios artificiais, que consistiram em dois ciclos de inoculação, foram realizados em enxertos e permitiram selecionar, em 1984, 92 clones de *P. densiflora* e 16 de *P. thunbergii*, cuja tolerância à DMP se mostrou ser superior à das famílias de *P. taeda* Linnaeus, utilizadas como plantas de controlo. Todos estes indivíduos foram reproduzidos em pomares clonais com vista à obtenção de semente, por polinização livre, em quantidade de forma a permitir a sua utilização em novas plantações. Desde 1992 que as descendências destes clones foram avaliadas anualmente quanto à tolerância à DMP através de testes de inoculação artificiais (Toda & Kurinobu, 1998; Toda & Kurinobu, 2002). O número de famílias selecionadas para *P. densiflora*, 92, permitiu avançar mais rapidamente no programa de avaliação genética em relação ao de *P. thunbergii*, já que apenas existiam inicialmente 16 indivíduos. Kurinobu (2008) refere que, nas condições em que decorreram os ensaios, o valor estimado para a heritabilidade de família para a sobrevivência foi de cerca de 0,8. Em ensaios de polinização controlada, que foram realizados entre árvores selecionadas de *P. thunbergii*, obtiveram-se estimativas da heritabilidade em sentido restrito de 0,62 (Kuramoto, 2007).

Entre 1992 e 1995, devido a uma lei que impedia a transferência de sementes ou plantas de uma área para a outra, foram estabelecidos outros programas de seleção de árvores candidatas a “plus” nas regiões norte e nordeste do Japão. Destas seleções resultaram respetivamente, em 1997, 35 novos clones resistentes de *P. thunbergii* e, em 2007, 13 clones de *P. thunbergii* e 50 de *P. densiflora*. Para a realização dos testes de inoculação do NMP às árvores candidatas foram utilizados não só enxertos, como também plantas de origem seminal (Nose & Shiraishi, 2008).

Em termos globais, desde 1987 estabeleceram-se, no Japão, 29 pomares produtores de semente de *P. densiflora* e 30 de *P. thunbergii* ocupando um total de cerca de 30 ha (Kurinobu, 2008). Atualmente, o Instituto Estatal de Investigação Florestal do Japão “Forestry and Forest Products Research Institute” refere a existência de cerca de 250 linhagens resistentes ao NMP que estão a ser disponibilizadas para arborização em massa (FFPRI, 2015).

Foram também realizados cruzamentos interespecíficos entre as diferentes espécies da subseção *Sylvestres*. Cruzaram-se as duas espécies *P. densiflora* e *P. thunbergii* e outras 14 espécies desta subseção, resultando num total de 28 combinações. Destacam-se as hibridações entre: 1) *P. densiflora* e *P. massoniana*, cujo resultado revelou uma elevada resistência a DMP bem como elevada fertilidade e crescimento, quando em comparação com as restantes combinações. Como tal, este híbrido foi utilizado nos programas de melhoramento entre 1983 e 1988 nas regiões ocidentais do Japão; 2) *P. taeda* e *P. rígida* Miller sendo que este resultado mostrou uma melhor resistência quando em comparação com

o cruzamento entre *P. thunbergi* e *P. densiflora*. A sua capacidade de tolerância ao frio e elevada capacidade de rebentamento são conhecidas, desconhecendo-se, no entanto, a sua capacidade de se adaptar às condições ambientais Japonesas, razão pela qual ainda não foi utilizado; 3) *P. thunbergi* e *P. densiflora*, sendo que se utilizou o *P. thunbergi* como mãe e o *P. densiflora* como pai. Nestes cruzamentos observou-se que a resistência era melhorada caso um ou ambos os progenitores fossem resistente para a maioria dos testes realizados. (Nose & Shiraishi, 2008).

Em 2001, foi iniciado na China, um programa de melhoramento, em parceria com o Japão, numa das zonas mais afetadas pela DMP foram selecionadas 288 árvores em 31 povoamentos. A sua descendência foi avaliada e os resultados do teste de inoculação revelaram uma percentagem de sobrevivência de cerca de 20%. Posteriormente, foram selecionadas 1.209 plantas resistentes provenientes das 251 famílias em estudo. A confirmação deste resultado, deve ser feita através de um novo ensaio de inoculação, após terem sido propagadas vegetativamente através da enxertia (Nose & Shiraishi, 2008).

1.3.1 As medidas de controlo aplicadas em Portugal

Após a identificação do NMP em Portugal foi aprovada a portaria nº 7/2000 de 7 de janeiro que estipulava a implementação de novas leis no que diz respeito ao abate, transporte e armazenamento da madeira de coníferas hospedeiras. Paralelamente, a Comunidade Europeia viu-se forçada a tomar decisões específicas, de forma a evitar a propagação da doença para outros países da Comunidade. Assim, surge a diretiva nº 2000/29/CE de 8 de maio relativa às medidas de proteção contra a introdução na comunidade de organismos prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais a contra a sua propagação no interior da comunidade.

No que se refere ao NMP determinaram-se novos procedimentos de tratamento a aplicar à madeira abatida, que posteriormente seria transportada para fora da zona afetada, seja em material em bruto ou transformado em material de embalagem ou outros produtos e ao longo dos anos, todos vários documentos foram sendo revistos e atualizados, sendo que atualmente estão em vigor para Portugal o Decreto-lei nº 95/2011 de 8 de agosto e na União Europeia, a decisão de execução da comissão nº 2012/535/EU, de 26 de Setembro, relativa a medidas de emergência contra a propagação na União de *B. xylophilus* (Steiner et Buhrer) Nickle *et al.* (nemátode da madeira do pinheiro).

Paralelamente às ações impostas pelos Decretos-lei e pela Comunidade Europeia, desde 1999 que existia, em Portugal, um Programa Nacional de Luta Contra o Nemátode da Madeira do Pinheiro (PROLUMP). Este programa tinha como objetivos a identificação e monitorização das zonas afetadas pelo NMP. Para tal, o país foi dividido em três zonas: Zona Afetada (ZA),

Zona Tampão (ZT) e Zona Isenta (ZI). A zona afetada correspondeu à área onde foram detetadas árvores sintomáticas, a zona tampão a uma área de segurança de 20 km que delimitava a área da ZA e a zona isenta representava a restante área do país considerada livre da DMP. Podia-se considerar uma quarta zona, a Zona de Restrição (ZR) formada pela ZA e pela ZT. Esta zona foi sujeita a monitorizações intensivas durante o outono e o inverno, onde se realizou o abate de árvores mortas ou em declínio, antes do início da primavera, ou seja, antes do início da época de voo do inseto vetor. Foram também realizadas monitorizações na ZI, de modo a detetar novos focos, especialmente nas zonas consideradas de risco, como é o caso dos portos e parques de armazenamento de madeira, entre outros (Sousa *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2013). Ainda no âmbito deste programa, em 2006 foi atribuída à Guarda Nacional Republicana/Serviço de Proteção da Natureza e do Ambiente (GNR/SEPNA), a responsabilidade de fiscalização do transporte da madeira abatida e de produtos derivados da mesma (ICNF, 2014).

Desde a sua definição, na península de Setúbal, que a ZR tem sofrido alterações, à medida que são descobertos novos focos, sendo que a área inicial de 48 mil ha aumentou para 80 mil ha em 2007 (Sousa *et al.*, 2012). Dado este elevado aumento, assumiu-se que as medidas iniciais não eram eficazes, tendo sido implementada, nesse ano uma faixa fitossanitária de 3 km em torno da ZR, onde foram abatidas todas as coníferas hospedeiras. Esta medida teve como objetivo evitar a dispersão do inseto vetor, eliminando todos os seus possíveis hospedeiros (Rodrigues *et al.*, 2013).

Contudo, em 2008 foram identificados novos focos fora da ZR, na região centro do país, mais concretamente nos concelhos de Arganil e Lousã (Rodrigues *et al.*, 2013). Esta nova deteção levou a uma nova revisão das estratégias de controlo, e foi criado o Programa de Ação Nacional para Controlo do Nemátode da Madeira do Pinheiro (PANCNMP) (ICNF, 2014). Este novo programa tem como principais objetivos: i) contenção do NMP em áreas onde este organismo está presente e disseminado; ii) erradicação do NMP em locais isolados, quando possível; iii) manter a Zona Tampão livre de coníferas hospedeiras do NMP com sintomas de declínio; iv) promover a fiscalização à circulação de material lenhoso e dos operadores económicos e retalhistas que operem com material lenhoso de coníferas hospedeiras; v) assegurar a eficaz realização do tratamento térmico de madeira, material de embalagem e de casca de coníferas, fiscalizações e controlo das atividades de exploração florestal por parte da GNR/SEPNA e da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). Atualmente, este programa ainda se encontra em vigor, na sua versão mais recente, para o período de 2013/2017, revisto em 2014. Nesta versão, as varias zonas, estabelecidas no ambito do PROLUMP, foram revistas sendo que neste momento todo o país é considerado ZR e é foi criada uma nova ZT, adjacente à fronteira espanhola (ICNF, 2014) (Fig.3).

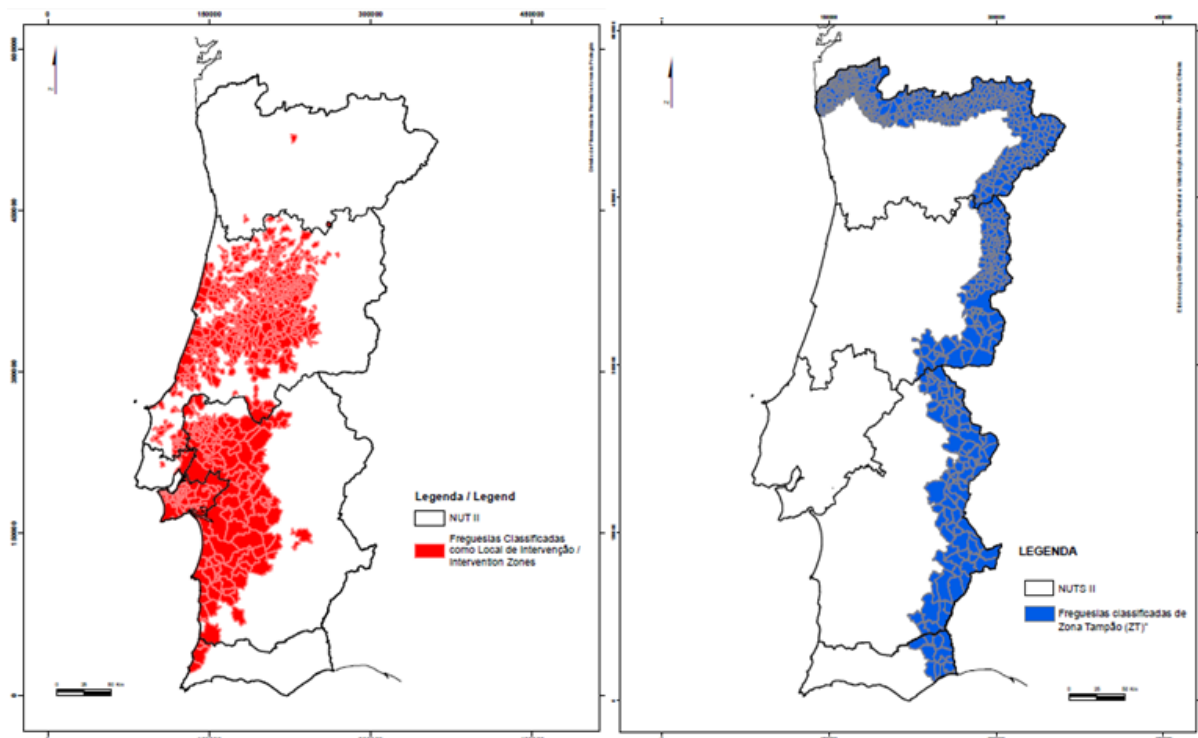


Figura 3: Freguesias classificadas como zonas de intervenção em 2015 (Esquerda); Freguesias classificadas como ZT em 2012 (Direita). Adaptada de ICNF: <http://www.icnf.pt/portal/florestas/prag-doe/ag-bn/nmp/infgeo>

Para além das normas definidas pela CE e pelo Governo, têm sido realizadas investigações com o fim de descobrir outras maneiras de eliminar a DMP através da intervenção ao nível do seu inseto vetor. Aquando do aparecimento da doença em Portugal, existiam poucos conhecimentos em relação ao ciclo de vida do *M. galloprovincialis*, dado até à data este ser considerado uma praga secundária. Foi por isso necessária a realização de ensaios de campo e estudos em condições de laboratório para se conhecerem a biologia do inseto bem como as suas interações com o hospedeiro e com o NMP (Naves *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2012).

Como método de monitorização das populações do inseto vetor, realizaram-se testes para determinar qual a armadilha mais eficaz na sua captura. A investigação dos atrativos mais eficazes é importante pois é através destas capturas que se pode determinar, por exemplo, a capacidade de transporte de nemátodes de um indivíduo (Álvarez *et al.*, 2014). Em Portugal, desde 2001 que têm sido realizados ensaios com vários tipos de armadilhas na região de Tróia (Setúbal), uma das mais afetadas pela DMP. Conclui-se que as armadilhas formadas por painéis cruzados transparentes (cross-vane traps) são o formato mais eficaz para a captura. Em relação ao isco colocado no seu interior, os estudos revelaram que a combinação de etanol e terbutina, em recipientes separados era a mais eficaz (Bonifácio *et al.*, 2012). Esta mistura é eficaz dado que representa a combinação entre o aroma do pinheiro

(caïromona) e as feromonas dos escolitídeos, pelas quais o inseto vetor é atraído, dado que estes insetos debilitam o seu hospedeiro, deixando-o em posição de ser utilizado pelas fêmeas de *Monochamus* para a oviposição. Mais tarde, Álvarez *et al* (2014) realizaram em Portugal, Espanha e França um novo estudo onde se determinou que as armadilhas do tipo “Cross-vane traps” se torna mais eficazes quando cobertas por teflon, Recentemente incluiu-se uma feromona de *M. galloprovincialis*, sendo que os seus efeitos ainda estão em estudo (Sousa *et al.*, 2012).

Outro possível método de combate do inseto vetor é a utilização de inseticidas aplicados por pulverização, contudo não são um método de combate viável para as condições portuguesas, dado que o seu período de voo é muito longo. Por outro lado, a localização das florestas, a sua grande utilização por parte dos humanos e a sua proximidade de campos agrícolas, ecossistemas aquáticos e reservas naturais, entre outros locais onde não é permitida a aplicação de tratamentos químicos reforça o facto de este não ser o método de controlo mais viável (Sousa *et al.*, 2012).

Recentemente têm sido testados diferentes tratamentos químicos com nematocidas, após terem sido utilizados com sucesso no Japão e nos EUA, como medida preventiva da disseminação da DMP. Em 2009, foram realizados ensaios de campo, onde se injetaram três concentrações de “benzoato de emamectina (BE)” no tronco de árvores vivas do qual se concluiu que esta aplicação era eficaz na prevenção de ataques de *Monochamus* durante o seu pasto de maturação. Determinou-se então que a concentração 0,064 g de s.a./cm DAP era a mais eficaz e que deveria ser recomendada como medida preventiva, aplicada apenas em pinheiros saudáveis com mais de 20 cm de DAP (Sousa *et al.*, 2012). No entanto este tratamento tem um custo elevado e é de difícil aplicação, sendo apenas realizável em pequenas área. Existem também estudos que procuram outros produtos eficazes contra o NMP, numa tentativa de reduzir os efeitos secundários causados pelos pesticidas. Outro método de controlo químico, desenvolvido em Portugal, é a utilização de uma rede de proteção impregnada com inseticida, durante o transporte da madeira, de modo a evitar a dispersão do inseto vetor (Sousa *et al.*, 2013).

Em relação ao controlo biológico do inseto vetor, têm vindo a ser realizados estudos para encontrar fungos ou parasitoides, contudo este método tem tido pouco sucesso, dado os inimigos naturais desta espécie serem generalistas, o que impede a sua utilização (Evans *et al.*, 1996; Sousa *et al.*, 2013).

Estão também a decorrer estudos genéticos com o objetivo de identificar genes candidatos, *loci* e marcadores moleculares relacionados com a resistência a DMP. Os resultados revelam que na fase inicial a uma defesa da doença principalmente relacionada como *stress* oxidativo,

bem como a produção da lenhina e etileno e a regulação pós-transcricional de ácidos nucleicos (Costa *et al.*, 2011). Por outro lado, também se encontram a ser realizadas hibridações artificiais entre *P. pinaster* e *P. halepensis*. A escolha destas espécies tem a ver com a adaptabilidade do pinheiro bravo as condições climáticas portuguesas e a resistência do pinheiro de alepo ao NMP (Sousa *et al.*, 2013).

1.4 Objetivos do trabalho

Embora a DMP tenha sido identificada em Portugal em 1999, só em 2009 se deu início à seleção fenotípica de árvores “plus” de pinheiro bravo. Foi, na Herdade da Comporta, uma das zonas grandemente afetada pela doença e nunca antes intervencionada, localizada na península de Setúbal, que se iniciou esta seleção. Os critérios para a seleção destas árvores foram a dominância em altura (árvores adultas dominantes), o DAP (maior que 20-25 cm), e a ausência de sintomatologia da DMP, ou seja, a ausência de manchas de agulhas acastanhadas. Identificaram-se 504 árvores candidatas a árvores “plus”, que foram monitorizadas ao longo de um ano. Durante este período, as árvores sintomáticas foram removidas, algum material lenhoso recolhido para análise da presença de NMP, utilizando marcadores moleculares, de forma a confirmar a causa de morte (Ribeiro *et al.*, 2012). Paralelamente, entre 2010 e 2011 recolheu-se de semente, individualizada por árvore candidata e em Novembro de 2012, A semente de 96 famílias foi semeada nos Viveiros da empresa Altri no Furadouro, Óbidos.

Neste estudo, pretende-se dar continuidade ao programa de melhoramento iniciado em 2009, através da avaliação das 96 famílias de meios-irmãos, utilizando para tal um ensaio de inoculação artificial em plantas de dois anos, com vista à avaliação da variabilidade de resposta à inoculação com NMP. Para tal, irá ser avaliada a variância genética das famílias. Paralelamente irá também ser avaliada a capacidade de reprodução dos nemátodes dentro das plantas, ou seja, a resistência destas após a inoculação.

De forma a concretizar estes objetivos, apresenta-se o seguinte plano de trabalho: 1) Introdução, composta por vários subcapítulos em que descrevem as diferentes componentes da doença, a sua distribuição mundial e quais as medidas de controlo aplicadas, até ao momento, para a seu combate; 2) Material e Métodos, onde são descritas as metodologias aplicadas no estabelecimento do ensaio de inoculação artificial, da extração dos nemátodes e da análise estatística dos resultados; 3) Resultados e Discussão, onde são apresentados e discutidos os resultados obtidos e 4) Conclusão e Perspetivas futuras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para este ensaio, utilizaram-se plantas de pinheiro bravo com dois anos de idade, provenientes de 96 famílias de meios-irmãos de árvores selecionadas como candidatas a “plus” para a tolerância/resistência à DMP, na Herdade da Comporta (HdC) (N38°21'28,52”; O8°45'49,89”), Alentejo. As árvores mãe incluídas no ensaio foram aleatoriamente escolhidas de entre as 504 árvores resultantes do programa de seleção fenotípica descrito em §1.4, a colheita de semente individualizada por árvore mãe foi realizada em 2010. A sementeira foi efetuada nos viveiros da empresa Altri, em Óbidos em Novembro de 2011.

2.2 Agente patogénico

O isolado de *B. xylophilus* Bx013.003, foi extraído de madeira infetada (N39°43'33,8”; O9°01'55,7”) através do método do Funil de Baerman modificado (Whitehead & Hemming, 1965) em 2013. A confirmação da sua identificação foi feita, pela equipa de nematologia do INIAV, com base nas características do grupo de espécies semelhantes a *B. xylophilus*: número de incisões laterais, forma da espícula, presença de prega vulvar e a forma da cauda da fêmea (Ryss *et al.*, 2005; Braasch *et al.*, 2009; Braasch & Schönfeld, 2015). Este isolado faz parte da coleção de nematologia do INIAV, sendo utilizado como um dos isolados de referência. Para tal tem sido mantido em meio de cultura inoculado com o fungo *Botrytis cinerea* não esporulado, a 25±1°C, sendo repicado a cada 14 dias.

2.3 Metodologias aplicadas

2.3.1 Delineamento experimental

O ensaio de inoculação realizado para avaliação da tolerância/resistência das árvores candidatas a “plus” decorreu durante 157 dias na estufa do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I. P.), em Oeiras, iniciando-se a 9 de setembro de 2014 e terminado a 17 de fevereiro de 2015.

Neste ensaio considerou-se um delineamento experimental de blocos casualizados completos, no qual as 96 famílias foram distribuídas aleatoriamente em cada uma das quatro bancadas (quatro blocos) (Anexo I), considerando como unidade experimental 15 plantas para cada uma das famílias. O ensaio continha um total de 5760 plantas (Figura:4).

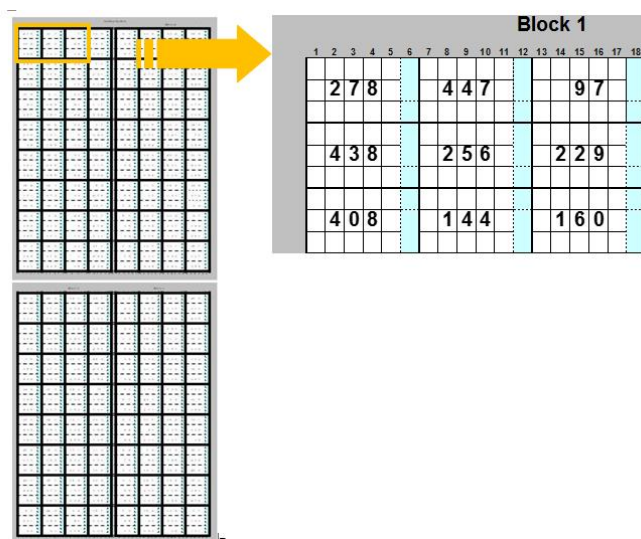


Figura 4: Esquema do delineamento experimental aplicado no ensaio de inoculação em estufa.

A estufa utilizada possui um sistema de arrefecimento tipo “cooling” acionado automaticamente para temperatura do ar superior a 35°C. As plantas foram automaticamente regadas todos os dias, durante 5 minutos.

Durante o ensaio, foram registados diariamente a temperatura do ar (°C) e a humidade relativa (%). Na Figura 5 está representada a humidade relativa média mensal bem como as temperaturas do ar médias e as médias das máximas e mínimas mensais registadas durante o período do ensaio.

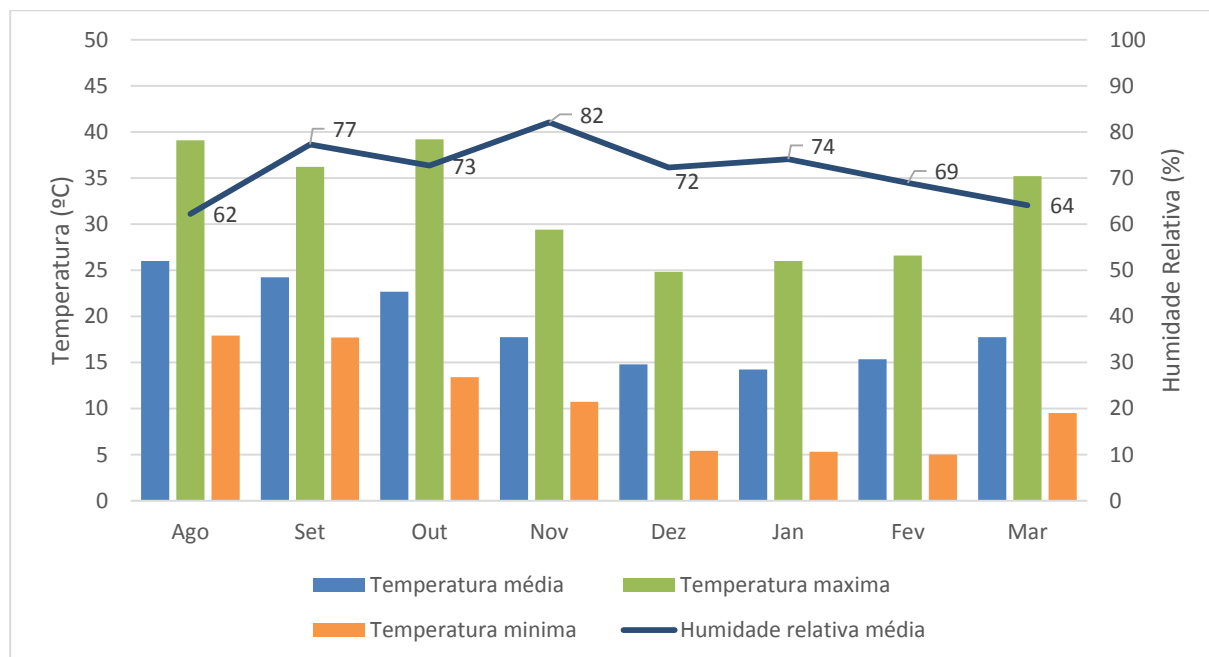


Figura 5: Evolução mensal das temperaturas média, máxima e mínima do ar e da humidade relativa média do ar na estufa correspondente ao período de duração do ensaio.

Durante o ensaio, a humidade relativa média rondou os 70%, tendo um pico máximo em novembro e um mínimo em agosto. Em relação às temperaturas médias observadas verificou-se que variaram entre 26 °C no mês de agosto e os 14°C no mês de janeiro, sendo que a temperatura máxima foi de 39°C observados no mês de outubro e a mínima foi de 5°C em fevereiro.

2.3.2 Técnica de inoculação das plantas

A metodologia de inoculação das plantas com a suspensão de NMP pode ser observada na Figura 6. Esta consistiu na realização de um pequeno corte longitudinal na parte superior da planta e posterior inoculação de 500µl de uma suspensão de 1000 nemátodes/ml. A escolha da concentração da suspensão utilizada resultou do estudo efetuado por Ribeiro (2012) onde se verificou que a maior mortalidade, nas plantas inoculadas correspondeu a uma suspensão com 500 NMP/ml. Este autor comparou diferentes concentrações: 250 NMP/ml, 500 NMP/ml e 750 NMP/ml. O local de inoculação foi protegido com algodão e parafilme de modo a prevenir a desidratação e possíveis infeções. A inoculação das plantas de cada bloco foi realizada no mais curto intervalo de tempo possível para garantir a homogeneidade das condições.



Figura 6: Processo de inoculação.

2.3.3 Variáveis estudadas

Para todas as plantas realizaram-se avaliações das variáveis dendrométricas: Altura total das plantas (cm) e o Diâmetro na base do caule (mm), adiante designados por altura e diâmetro.

A sobrevivência foi calculada para cada família, em cada um dos blocos, através do quociente entre o número de plantas vivas e o número total de plantas por família (15 plantas). Considerou-se uma planta viva, como aquela em que, pelo menos, 50% das agulhas se apresentavam verdes (Figura 7 A e B) e como planta morta, quando mais de 50% das agulhas se encontravam castanhas (Figura 7 C). Esta variável foi avaliada em quatro datas após a inoculação (DAI): 27, 38, 56 e 157 dias após a inoculação (DAI).

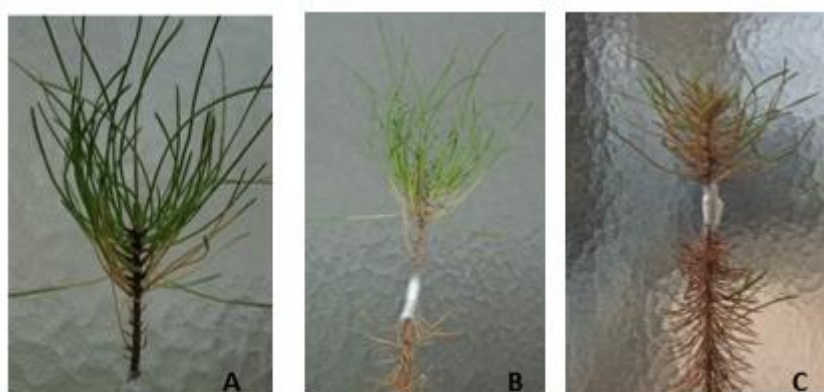


Figura 7: Vários estados de sintomatologia das plantas. A e B: planta viva; C: planta morta.

Aos 38 DAI foi quantificado o número de nemátodes extraído em plantas selecionadas. Para tal, duas plantas, em cada bloco, (8 plantas por família), foram selecionadas num total de seis famílias que, na globalidade do ensaio, apresentaram graus de mortalidade diferentes. Assim, escolheram-se duas famílias com mortalidade acima de 80% (Famílias 140 e 445), duas com mortalidade entre 50 a 60% (Famílias 260 e 486) e duas com mortalidade inferior a 50% (Famílias 462 e 480). A extração dos nemátodes foi realizada utilizando o método do funil de Baermann modificado (Whitehead & Hemming, 1965). Segundo este método, numa primeira fase, foram retiradas todas as agulhas e raízes da planta, deixando apenas o caule. Este foi cortado em pequenas frações e deixado submerso em água, pelo menos durante 48 horas, para permitir a migração dos nemátodes vivos da madeira para a água. Os nemátodes extraídos por crivagem (malha 400 mesh/38µm) foram contados em câmara de contagem de nemátodes (Hawksley, England).

2.4 Análise Estatística

2.4.1 Variáveis Altura, Diâmetro e Sobrevivência

2.4.1.1 Modelos ajustados

Para analisar os dados referentes às variáveis altura, diâmetro e sobrevivência foram ajustados modelos mistos. Para a altura e diâmetro ajustaram-se modelos lineares mistos com o objetivo de averiguar a necessidade da sua introdução como covariáveis no modelo de avaliação da sobrevivência, avaliando-se a variabilidade das famílias quanto a essas características. No caso dos dados da sobrevivência, ajustaram-se modelos lineares mistos generalizados com a finalidade de estimar a variabilidade genética das famílias e prever os efeitos genéticos das famílias para esta característica.

O modelo misto geral para a análise dos dados pode ser escrito, sob notação matricial, como

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{u} + \mathbf{e} \quad (1)$$

onde $\mathbf{y}_{(n \times 1)}$ é o vetor das observações, $\mathbf{X}_{(n \times p)}$ é a matriz de delineamento dos efeitos fixos, $\boldsymbol{\beta}_{(p \times 1)}$ é o vetor de efeitos fixos, $\mathbf{Z}_{(n \times q)}$ é a matriz de delineamento dos efeitos aleatórios, $\mathbf{u}_{(q \times 1)}$ é o vetor de efeitos aleatórios e $\mathbf{e}_{(n \times 1)}$ é o vetor dos erros aleatórios.

Os vetores, \mathbf{u} e \mathbf{e} , assumem-se independentes com distribuição normal multivariada com valor médio $\mathbf{0}_{(n \times 1)}$ e matrizes de variâncias-covariâncias, respetivamente $\mathbf{G}_{(q \times q)}$ e $\mathbf{R}_{(n \times n)}$. Na sua versão mais simples,

$$\mathbf{G} = \sigma_u^2 \mathbf{I}_q$$

e

$$\mathbf{R} = \sigma_e^2 \mathbf{I}_n,$$

sendo \mathbf{I}_q e \mathbf{I}_n matrizes identidade $q \times q$ e $n \times n$, respetivamente.

Em geral, a distribuição de \mathbf{y} é normal multivariada com valor médio $\mathbf{X}\boldsymbol{\beta}$ e matriz de variâncias-covariâncias \mathbf{V} ,

$$\mathbf{V} = \mathbf{Z}\mathbf{G}\mathbf{Z}^T + \mathbf{R},$$

onde \mathbf{Z}^T é a transposta de \mathbf{Z} .

Para a análise da variabilidade das famílias relativamente à altura e ao diâmetro das plantas, no modelo (1), \mathbf{y} representa o vetor com as n observações relativas à característica avaliada (altura ou diâmetro), o vetor $\boldsymbol{\beta}$ inclui a média geral e os efeitos dos blocos do ensaio, \mathbf{u} é um vetor com os efeitos da família (tantos quanto o número de famílias do ensaio) e \mathbf{e} é um vetor com n erros aleatórios associados às n observações. Resumindo, tem-se

$$altura_{ij} = \mu + bloco_i + familia_j + e_{ij}$$

$$diâmetro_{ij} = \mu + bloco_i + familia_j + e_{ij}.$$

para $i = 1, \dots, 4$ e $j = 1, \dots, 96$, em que: $altura_{ij}$ e $diâmetro_{ij}$ representam a média da altura e do diâmetro no bloco i para a família j , respetivamente; μ representa a média populacional; $bloco_i$ representa o efeito associado ao bloco i ; $familia_j$ representa o efeito associado à família j . Os efeitos dos blocos assumem-se fixos e os efeitos das famílias como variáveis aleatórias independentes e identicamente distribuídas (*i.i.d.*), com distribuição normal de valor médio 0 e variância σ_{fam}^2 . Os erros aleatórios assumem-se variáveis aleatórias *i.i.d.* com distribuição normal, de valor médio 0 e variância σ_e^2 . Os efeitos das famílias e os erros associados às observações assumem-se variáveis aleatórias mutuamente independentes.

Genericamente, o modelo linear misto generalizado ajustado aos dados da sobrevivência, sob notação matricial, é caracterizado por três componentes fundamentais: 1) componente aleatória, 2) componente sistemática e 3) função de ligação.

1. A componente aleatória é representada pela variável resposta que se pretende modelar, da qual temos n observações independentes e cuja distribuição de probabilidades (condicional aos efeitos aleatórios) faz parte da família exponencial.
2. A componente sistemática consiste numa combinação linear do tipo,

$$\eta = X\beta + Zu,$$

com $u \sim N(0, G)$.

3. A função de ligação, g , é uma função diferenciável e monótona que associa as componentes aleatória e sistemática, através da relação:

$$g(E[y|u]) = X\beta + Zu,$$

sendo

y o vetor com as n observações;

$E[y|u]$, o vetor de valores esperados condicionais de y dado u .

Se a função g é invertível, então

$$E[y|u] = g^{-1}(X\beta + Zu) = g^{-1}(\eta).$$

Na análise dos dados relativos à sobrevivência, com $y_{ij}|familia_j \sim Binomial(n_{ij}, \pi_{ij})$, foram consideradas duas funções de ligação: a função *logit* (função de ligação canónica, $\ln \left[\frac{\pi_{ij}}{1-\pi_{ij}} \right]$) e a função *probit* ($\phi^{-1}(\pi_{ij})$). Concretizando, o modelo *logit* ajustado pode ser descrito como

$$\ln \left[\frac{\pi_{ij}}{1-\pi_{ij}} \right] = \mu + bloco_i + \beta_1 altura_{ij} + \beta_2 diâmetro_{ij} + familia_j,$$

e o modelo *probit* como

$$\phi^{-1}(\pi_{ij}) = \mu + \text{bloco}_i + \beta_1 \text{altura}_{ij} + \beta_2 \text{diâmetro}_{ij} + \text{família}_j,$$

para $i = 1, \dots, 4$ e $j = 1, \dots, 96$, em que:

n_{ij} é o número de observações para a família j no bloco i ;

π_{ij} é a probabilidade de sobrevivência para a família j no bloco i ;

$\Phi^{-1}(\cdot)$ é a inversa da função de distribuição cumulativa da normal reduzida;

μ é a média geral;

bloco_i é o efeito (considerado como fixo) associado ao bloco i ;

β_1 e β_2 são os coeficientes de regressão associados às variáveis altura e diâmetro, respetivamente;

altura_{ij} e diâmetro_{ij} representam a média da altura e do diâmetro no bloco i para a família j , respetivamente;

família_j é o efeito (considerado como aleatório) associado à família j . Estes efeitos da família assumem-se variáveis aleatórias *i.i.d.* com distribuição normal, de valor médio 0 e variância σ_{fam}^2 .

A análise dos dados foi conduzida no SAS version 9.3 (SAS Institute Inc. 2010). Para o ajustamento dos modelos lineares mistos foi utilizado o PROC MIXED e para o ajustamento dos modelos lineares mistos generalizados foi utilizado o PROC GLIMMIX.

2.4.1.2 Avaliação da variabilidade genética em famílias de meios-irmãos

No caso dos modelos lineares mistos, os parâmetros de variância foram estimados pelo método de estimação de máxima verosimilhança restrita, ou residual (REML; Patterson & Thompson, 1971). A componente de variância das famílias foi testada ($H_0: \sigma_{fam}^2 = 0$ vs $H_1: \sigma_{fam}^2 > 0$) através de um teste de razão de verosimilhanças restritas. De acordo com Self & Liang (1987) e Stram & Lee (1994), ao testar uma única componente de variância, a distribuição assintótica da estatística do teste é uma mistura de distribuições qui-quadrado ($0.5\chi_0^2 + 0.5\chi_1^2$).

No caso particular dos modelos lineares mistos generalizados, as componentes de variância foram estimadas usando o método da pseudo máxima verosimilhança restrita (Littell *et al.*, 2006; Stroup, 2013). O *p-value* do teste à componente de variância das famílias foi também baseado numa mistura de distribuições qui-quadrado.

Ao testar a componente de variância das famílias, conclui-se sobre a existência de variabilidade genética aditiva, uma vez que numa família de meios-irmãos a variância genética aditiva (σ_a^2) é estimada como sendo quatro vezes a variância das famílias (Falconer & Mackay, 1996). Desta forma, obtém-se informação sobre o valor que é transmitido pelos progenitores para a sua descendência.

Convém salientar que o modelo *probit* foi ajustado devido às suas vantagens no contexto da genética quantitativa, cuja teoria é fortemente alicerçada na distribuição normal. Neste contexto, as componentes de variância têm um significado genético e a utilização de uma função de ligação *probit* mantém esse significado quando a variável resposta é binomial (Stroup, 2013).

2.4.1.3 Avaliação do desempenho da família

Os melhores estimadores lineares empíricos não enviesados (EBLUEs) dos efeitos fixos e os melhores preditores lineares empíricos não enviesados (EBLUPs) dos efeitos aleatórios (isto é, efeitos das famílias) obtiveram-se a partir das equações do modelo misto (Henderson, 1975; Searle *et al.*, 1992; Stroup, 2013). No caso dos dados da sobrevivência, os EBLUEs e EBLUPs foram obtidos na escala *logit* e *probit*. A identificação das famílias com superioridade para as características em análise, foi realizada com base na ordenação dos EBLUPs dos efeitos das famílias para essas características.

A probabilidade estimada da sobrevivência da família j no bloco i ($\hat{\pi}_{ij}$) foi obtida, a partir da inversa da função *logit*, como:

$$\hat{\pi}_{ij} = \frac{1}{1 + e^{[-EBLUE(\mu + bloco_i + b_1 altura_{ij} + b_2 diâmetro_{ij}) - EBLUP(família_j)]}}$$

Para a interpretação dos resultados de cada família relativamente à sobrevivência, foi utilizada a percentagem média de sobrevivência estimada para a família j ao longo dos 4 blocos:

$$\bar{\pi}_{.j} = \left(\frac{\sum_{i=1}^4 \hat{\pi}_{ij}}{4} \right) \times 100.$$

A seleção das famílias com maior resistência/tolerância à DMP foi realizada com base na ordenação desta percentagem média de sobrevivência estimada.

2.4.2 Variável Número de nemátodes extraídos

O primeiro passo realizado para a análise da contagem do número de nemátodes nas seis famílias que, na globalidade do ensaio, apresentaram graus de mortalidade diferentes, baseou-se numa abordagem descritiva, envolvendo a construção de um diagrama de extremos e quartis. Seguidamente, optou-se por uma abordagem não paramétrica para a análise dos dados relativos ao Número de nemátodes extraídos, recorrendo-se ao teste de

Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952; Siegel, 1975). Neste contexto, testaram-se as hipóteses H_0 : os valores observados relativos ao número de nemátodes por planta em cada família são globalmente semelhantes ($H_0: F_i(y) = F(y), \forall y \in \mathbb{R}, \forall i = 1, \dots, k$, sendo $F_i(y)$ a função distribuição cumulativa das observações correspondentes à família i , com $k = 6$) vs H_1 : existem famílias com número de nemátodes globalmente mais elevado (ou menos elevado) que outras ($H_1: \exists i, j \text{ t.q. } F_i(y) < F_j(y), \forall y \in \mathbb{R}$). A estatística de Kruskal-Wallis é dada por:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k n_i \bar{R}_i^2 - 3(n+1),$$

sendo \bar{R}_i a média das ordens das n_i observações da família i e $n = \sum_{i=1}^k n_i$. Sob H_0 , a estatística de Kruskal-Wallis segue assintoticamente uma distribuição qui-quadrado com $k - 1$ graus de liberdade.

A análise dos dados foi conduzida no programa **R** (<https://www.r-project.org/>), recorrendo às funções *boxplot* e *kruskal.test*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da variabilidade das famílias

A análise da variabilidade das famílias para as variáveis altura e diâmetro pode ser observada no Quadro 1. Pela sua análise, pode-se verificar a existência de variabilidade das famílias, quer para a variável altura quer para o diâmetro, ou seja, de variância genética aditiva para as características em estudo. Neste Quadro apresenta-se ainda os valores médios, os máximos e os mínimos observados, para as variáveis altura e diâmetro, verificando-se que, quer a altura quer o diâmetro apresentam uma amplitude de variação quase dos simples para o dobro.

Quadro 1: Estimativas das componentes de variância das famílias (σ_{Fam}^2) e do erro (σ_e^2), da média, do máximo e do mínimo, para as variáveis altura e diâmetro

Variável	$\hat{\sigma}_{Fam}^2$ (p-value)	$\hat{\sigma}_e^2$	Média	Máximo	Mínimo
Altura (cm)	16,061 (<0,001)	8,5584	33,789	43,68	23,14
Diâmetro (mm)	0,107 (<0,001)	0,1050	4,622	5,65	3,75

Nota: Rejeita-se $H_0: \sigma_{fam}^2 = 0$, se p-value < 0,05.

A existência de variabilidade das famílias para as variáveis em estudo justifica a amplitude encontrada para os EBLUPs para a altura e diâmetro (Quadro 2 e Anexo II).

Quadro 2: Ordenação decrescente do melhor preditor linear não enviesado empírico (EBLUP) dos efeitos da família para as variáveis altura e diâmetro para 24 das 96 famílias estudadas

Ordenação	Família	EBLUP Altura (cm)	Família	EBLUP Diâmetro (mm)
1	421	8,717	460	0,827
2	446	7,506	446	0,684
3	460	7,261	421	0,628
4	174	6,961	94	0,576
5	465	6,860	174	0,542
6	94	6,745	310	0,502
7	447	6,322	371	0,500
8	310	6,295	248	0,436
9	248	6,202	161	0,416
10	414	6,105	414	0,407
11	371	5,106	16	0,357
12	152	4,952	465	0,355
...				
85	137	-3,284	144	-0,315
86	281	-3,747	146	-0,321
87	231	-3,944	311	-0,341
88	229	-4,182	151	-0,345
89	339	-5,027	367	-0,357
90	311	-5,651	438	-0,363
91	144	-6,200	163	-0,389
92	343	-8,270	449	-0,417
93	33	-8,338	39	-0,425
94	39	-8,587	165	-0,552
95	48	-9,011	343	-0,646
96	278	-9,401	33	-0,702

Por exemplo, para a família 421 prevê-se que a altura seja de 8,717 cm acima da média geral das famílias (33,789 cm), enquanto que, para a família 278, seja 9,401 cm inferior. Relativamente à variável diâmetro, prevê-se que as famílias 460 e 33 sejam respetivamente, 0,827 mm superior e 0,702 mm inferior ao valor da média (4,622 mm).

Os resultados referentes ao ajustamento do modelo *logit* constam no Quadro 3. Verifica-se que a variância das famílias foi significativamente diferente de zero, no que diz respeito à sobrevivência, para as quatro datas observadas após a inoculação. Estes resultados estão de acordo com Ribeiro (2012) que, num estudo realizado com plantas jovens provenientes de nove famílias de meios-irmãos testadas e existentes no PCPS de pinheiro bravo das MNE (programa de melhoramento genético para o volume e forma do tronco) verificou a existência de diferenças significativas na resposta das famílias à inoculação artificial com NMP.

Relativamente ao coeficiente da variável altura, observou-se que aos 27 DAI, a influência desta variável foi significativamente positiva para a sobrevivência. No entanto, este resultado não se manifestou nas restantes datas. Aos 38, 56 e 157 DAI não existiram evidências para rejeitar a hipótese nula. Já para a variável diâmetro, verificou-se que aos 27 DAI, esta não apresentou um efeito significativo sobre a sobrevivência. Contudo, nas avaliações anteriores aos, 38, 56 e 157 DAI, verificou-se uma influência significativamente positiva desta variável na sobrevivência. A altura da planta parece ser uma característica importante para a sobrevivência nos primeiros dias após a inoculação, mas posteriormente (após os 38 DAI), já não parece influenciar. Pelo contrário, o diâmetro, não tendo influência nos primeiros dias após a inoculação (27 DAI), pode prolongar a sobrevivência da planta, ou seja, algum tempo após a inoculação, independentemente da sua altura, as plantas com maior diâmetro podem ser menos afetadas pela DMP. Também Ribeiro (2012) estudou a influência da altura e do diâmetro na mortalidade de plantas de dois anos após a sua inoculação com NMP aos 14, 35, 47 e 92 DAI e verificou que, para os 35 e 47 DAI, quanto maiores fossem o diâmetro e a altura da planta, menor a sua mortalidade. Mais tarde, aos 92 DAI, apenas o diâmetro influenciou a mortalidade.

Quadro 3: Estimativas da componente de variância das famílias (σ_{Fam}^2) relativa à sobrevivência e dos coeficientes associados à altura (β_1) e ao diâmetro (β_2), resultantes do ajustamento do modelo *logit* aos dados obtidos nas quatro datas de observação após a inoculação (DAI)

DAI	$\hat{\sigma}_{Fam}^2$ (p-value)	$\hat{\beta}_1$ (p-value)	$\hat{\beta}_2$ (p-value)
27	0,301 (<0,001)	0,052 (0,007)	0,138 (0,487)
38	0,160 (<0,001)	0,018 (0,238)	0,315 (0,046)
56	0,217 (<0,001)	0,006 (0,718)	0,488 (0,004)
157	0,244 (<0,001)	0,001 (0,946)	0,719 (0,001)

Nota: Rejeitam-se as hipóteses nulas ($H_0: \sigma_{Fam}^2 = 0$; $H_0: \beta_1 = 0$; $H_0: \beta_2 = 0$) se *p-value* < 0,05

Os resultados referentes ao ajustamento do modelo *probit* aos dados da sobrevivência aos 157 DAI constam no Quadro 4.

Quadro 4: Estimativas das componentes de variância das famílias (σ_{Fam}^2) e do erro (σ_e^2), resultantes do ajustamento do modelo *probit* aos dados obtidos aos 157 dias após a inoculação

Variável	$\hat{\sigma}_{Fam}^2(p\text{-value})$	$\hat{\sigma}_e^2$
Sobrevivência aos 157 DAI	0,063 (0,002)	2,190

Nota: Rejeita-se a hipótese nula ($H_0: \sigma_{fam}^2 = 0$) se $p\text{-value} < 0,05$

Em concordância com o resultado obtido com o modelo *logit*, a variância genética aditiva das famílias é significativa, no entanto, verifica-se que a estimativa da variância do erro é elevada comparativamente à estimativa obtida para a variância das famílias. Já que esta é uma característica que pode ser influenciada por muitos fatores não controlados (número de nemátodes da suspensão inoculada na planta e o número que efetivamente entra na planta, critério de avaliação dos sintomas, etc.) e por outros genéticos intrínsecos à própria família, como altura e diâmetro, uma estratégia possível para aumentar a estimativa deste parâmetro genético e, conseqüentemente, o ganho genético ao selecionar as melhores famílias, poderá passar, em trabalhos futuros, por aumentar o número de blocos do ensaio, nem que para isso, seja necessário diminuir o número de plantas por parcela dentro do bloco. Este procedimento conduziria certamente a uma diminuição da estimativa variância do erro ao nível da média das famílias, acompanhado por um aumento da eficiência da seleção (menor erro padrão de predição).

Nos Quadros 5 e 6 encontram-se, para as quatro datas de observação após a inoculação, a ordenação decrescente dos melhores preditores lineares não enviesados empíricos (EBLUPs) dos efeitos da família relativamente à sobrevivência (escala logit), bem como da percentagem de sobrevivência média estimada ($\bar{\pi}_j$). Esta variou de 84,6% aos 27 DAI para 11,2% aos 157 DAI. Em ambos os quadros, apresenta-se as primeiras e últimas 10 famílias, bem como três intermédias, constituindo um excerto dos anexos III e IV. Pela sua observação, pode-se concluir que as melhores e as piores famílias variam ao longo das quatro datas de observação. Também as famílias com maior EBLUP não coincidem com as que apresentam uma maior percentagem de sobrevivência. Esta discrepância de comportamento das famílias pode ser explicada pelo facto dos valores obtidos para a percentagem de sobrevivência, não só dependerem do efeito genético da família para esta característica, como também das estimativas dos outros efeitos do modelo, nomeadamente da altura e do diâmetro. Por exemplo, para os 157 DAI, a família 152 apresenta simultaneamente a maior sobrevivência média e o maior EBLUP da sobrevivência, mas a família 446 que se situa entre as 10 primeiras, no que diz respeito à percentagem de sobrevivência, apresenta um EBLUP do

efeito desta característica próximo de zero. Certamente que para esta última família, tal é justificado pelos seus elevados valores médios de altura e diâmetro (Quadro 2). Por outro lado, a família 33, que apresenta a menor sobrevivência média estimada, também apresenta um EBLUP próximo de zero, o que pode ser explicado pelo facto de ser uma família com baixa altura e reduzido diâmetro (Quadro 2). Isto é, a comparação das famílias ordenadas por EBLUP da sobrevivência ou por percentagem média de sobrevivência indica claramente a existência de uma relação positiva entre os efeitos genéticos da altura ou do diâmetro com os da sobrevivência. Assim poder-se-á estabelecer que, a estratégia de seleção para a DMP deverá passar pela escolha das famílias com maior percentagem de sobrevivência média, pois desta forma, estarão também a ser incluídos todos os efeitos que contribuem para uma maior sobrevivência. Ao seguir este critério de seleção, seleccionam-se famílias que conjugam efeitos genéticos favoráveis ao combate à DMP. Em termos práticos, isto significa que a opção será seleccionar, por exemplo, as 10 primeiras famílias apresentadas no Quadro 6 referentes aos 157 DAI.

A análise dos resultados apresentados no Quadro 6 mostra ainda uma mudança de ordenação das famílias nas quatro datas de observação o que corresponde pois a um comportamento diferenciado entre elas. Com vista a visualizar este comportamento construiu-se a Figura 8 com oito das 96 famílias. Destacam-se famílias que, nas quatro datas de observação, estão sempre no topo da sobrevivência (Famílias 152, 77, 421), uma família que começa com uma percentagem média de sobrevivência próxima da média geral, mas na última data de avaliação se encontra entre as 10 últimas (caso da família 137), uma família que começa com uma percentagem de sobrevivência próxima da média e acaba nas 10 primeiras (Família 260) e uma família que começa abaixo da média e acaba nas 10 últimas (Família 33).

Quadro 5: Ordenação dos melhores preditores lineares não enviesados empíricos (EBLUPs) dos efeitos da família relativamente à sobrevivência (escala *logit*), e correspondente percentagem de sobrevivência estimada ($\hat{\pi}_j$) para 23 das 96 famílias, nas quatro datas observadas após a inoculação (DAI)

Ordenação	27 DAI			38 DAI			56 DAI			157 DAI		
	Família	EBLUP	$\hat{\pi}_j$ (%)	Família	EBLUP	$\hat{\pi}_j$ (%)	Família	EBLUP	$\hat{\pi}_j$ (%)	Família	EBLUP	$\hat{\pi}_j$ (%)
1	176	0,621	90,6	152	0,700	68,1	152	0,937	53,8	152	0,903	25,2
2	165	0,569	89,6	77	0,587	61,4	146	0,863	43,5	77	0,871	20,7
3	77	0,544	91,6	146	0,552	57,4	77	0,814	46,1	282	0,638	20,7
4	152	0,543	93,2	176	0,499	59,0	165	0,671	35,5	146	0,563	13,5
5	146	0,543	89,9	165	0,477	52,9	84	0,600	38,5	276	0,494	14,5
6	262	0,532	91,7	180	0,446	60,5	358	0,513	43,5	17	0,485	12,9
7	462	0,515	90,3	31	0,382	54,0	480	0,503	38,7	144	0,431	12,1
8	446	0,469	94,2	480	0,379	55,7	31	0,503	37,1	50	0,397	14,2
9	180	0,457	91,0	421	0,363	66,2	276	0,470	36,0	181	0,382	16,1
10	421	0,440	94,5	276	0,358	53,0	462	0,442	34,9	447	0,365	18,0
...												
53	272	0,017	84,8	486	-0,035	44,4	203	-0,041	25,8	371	-0,087	14,6
54	168	0,009	88,2	448	-0,041	47,9	373	-0,052	26,0	39	-0,111	6,6
55	166	0,006	83,3	235	-0,051	48,1	272	-0,057	26,1	315	-0,115	8,3
...												
87	407	-0,545	78,4	167	-0,343	38,2	488	-0,409	21,1	488	-0,389	7,3
88	367	-0,545	78,5	439	-0,357	38,6	439	-0,416	19,6	238	-0,394	9,1
89	149	-0,549	78,5	149	-0,384	39,4	409	-0,439	23,4	278	-0,396	5,8
90	174	-0,677	83,4	407	-0,404	40,0	445	-0,447	18,5	256	-0,397	9,1
91	439	-0,712	77,2	476	-0,447	34,6	145	-0,476	20,8	94	-0,434	11,3
92	460	-0,829	82,0	248	-0,463	43,4	149	-0,480	20,8	49	-0,447	8,2
93	140	-0,900	69,5	445	-0,490	34,1	140	-0,533	20,2	131	-0,485	7,1
94	445	-0,942	70,1	460	-0,510	46,4	476	-0,550	17,2	235	-0,495	8,9
95	131	-1,102	62,0	140	-0,563	34,6	460	-0,625	27,0	140	-0,508	7,4
96	248	-1,142	74,2	131	-0,663	30,8	131	-0,648	17,4	460	-0,596	12,0

Quadro 6: Ordenação da percentagem de sobrevivência estimada ($\hat{\pi}_j$) e correspondentes melhores preditores lineares não enviesados empíricos (EBLUPS) dos efeitos da família relativamente à sobrevivência (escala *logit*) para 23 das 96 famílias, nas quatro datas observadas após a inoculação (DAI)

Ordenação	27 DAI			38 DAI			56 DAI			157 DAI		
	Família	$\hat{\pi}_j$ (%)	EBLUP	Família	$\hat{\pi}_j$ (%)	EBLUP	Família	$\hat{\pi}_j$ (%)	EBLUP	Família	$\hat{\pi}_j$ (%)	EBLUP
1	421	94,5	0,440	152	68,1	0,700	152	53,8	0,937	152	25,2	0,903
2	446	94,2	0,469	421	66,2	0,363	77	46,1	0,814	282	20,7	0,638
3	152	93,2	0,543	77	61,4	0,587	358	43,5	0,513	77	20,7	0,871
4	161	92,3	0,354	180	60,5	0,446	146	43,5	0,863	421	19,6	0,139
5	310	92,1	0,234	176	59,0	0,499	421	42,0	0,157	260	18,3	0,344
6	262	91,7	0,532	358	58,3	0,289	180	40,2	0,423	447	18,0	0,365
7	282	91,7	0,400	161	58,2	0,179	282	39,5	0,375	446	17,4	-0,049
8	94	91,6	0,139	146	57,4	0,552	480	38,7	0,503	358	16,7	0,343
9	77	91,6	0,544	446	56,5	-0,052	84	38,5	0,600	414	16,4	0,135
10	414	91,5	0,151	282	56,5	0,238	414	38,5	0,165	181	16,1	0,382
...												
54	272	84,8	0,017	373	46,7	0,000	248	27,2	-0,379	462	10,0	0,116
55	235	84,7	0,021	231	46,6	0,119	231	27,1	0,065	160	9,9	-0,334
56	281	84,7	0,161	460	46,4	-0,510	460	27,0	-0,625	417	9,6	-0,203
...												
87	163	78,3	-0,264	167	38,2	-0,343	140	20,2	-0,533	84	6,9	-0,243
88	144	77,9	-0,097	166	37,6	-0,264	48	19,8	-0,249	39	6,6	-0,111
89	439	77,2	-0,712	278	36,3	-0,159	439	19,6	-0,416	166	6,6	-0,337
90	483	74,8	-0,521	449	35,9	-0,318	298	19,3	-0,401	137	6,5	-0,333
91	248	74,2	-1,142	140	34,6	-0,563	367	19,2	-0,309	449	6,4	-0,210
92	343	70,5	-0,308	476	34,6	-0,447	445	18,5	-0,447	48	6,2	-0,314
93	445	70,1	-0,942	48	34,1	-0,259	449	18,1	-0,338	438	6,1	-0,307
94	140	69,5	-0,900	445	34,1	-0,490	131	17,4	-0,648	343	5,9	-0,064
95	278	67,3	-0,453	131	30,8	-0,663	476	17,2	-0,550	278	5,8	-0,396
96	131	62,0	-1,102	343	30,4	-0,304	343	15,9	-0,307	33	5,7	-0,048
Média $\hat{\pi}_j$		84,6			47,4			29,0			11,2	

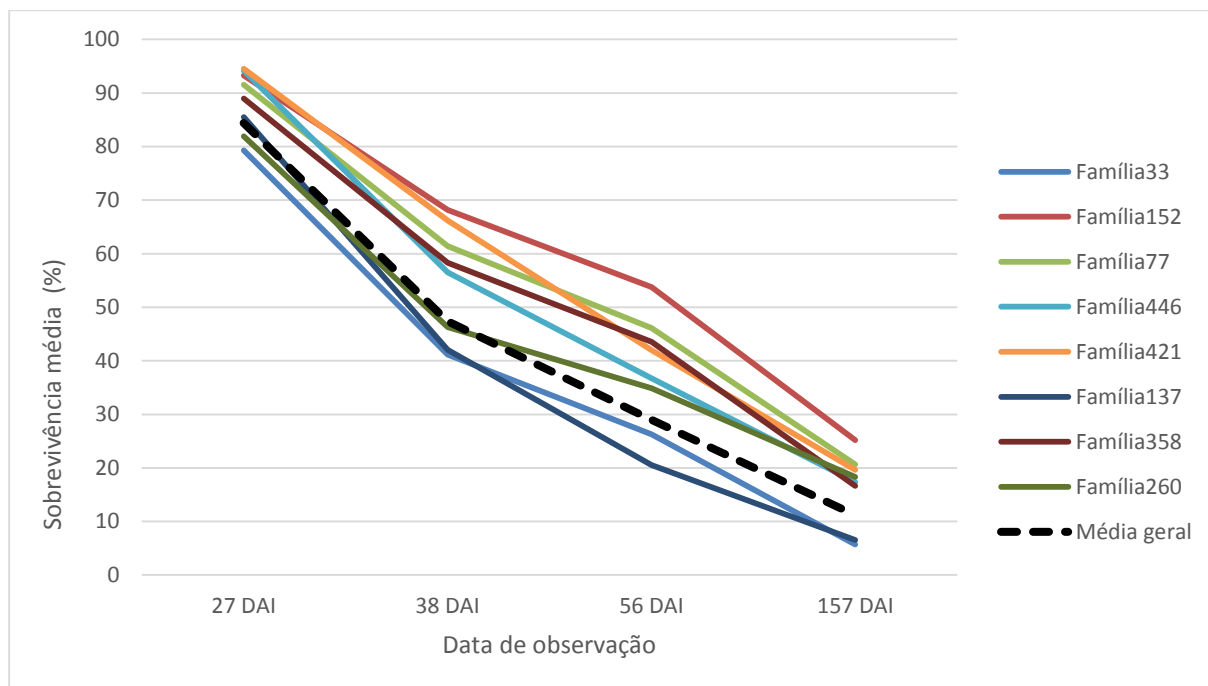


Figura 8: Percentagem de sobrevivência média ($\bar{\pi}_{..}$), estimada algumas famílias nas quatro datas de observação após a inoculação (DAI).

3.2 Avaliação do número de nemátodes extraídos

A identificação morfológica de *B. xylophilus* nas plantas recolhidas no ensaio aos 38 DAI confirmou a causa da sua morte como sendo a DMP, indicando o sucesso do processo de inoculação das plantas com o nemátode.

A distribuição do número de nemátodes por família, através de um diagrama de extremos e quartis, apresenta-se na Figura 9.

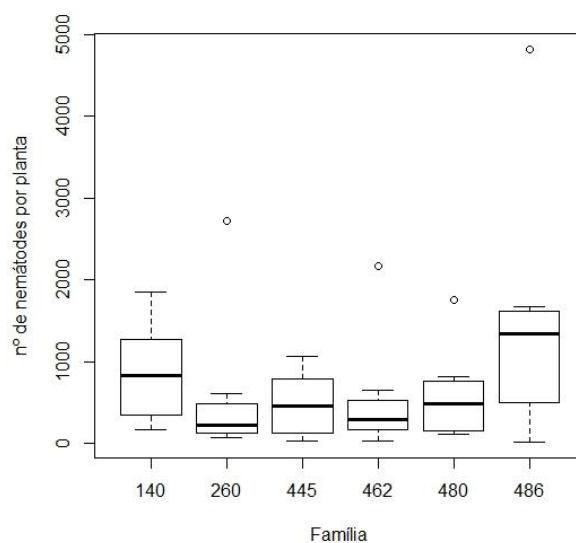


Figura 9: Distribuição do número de nemátodes por família

Ao analisar o diagrama, observa-se que as famílias 140, 445 e 480 apresentam uma distribuição simétrica, respectivamente, com medianas (\tilde{x}): 828, 455 e 495 nemátodes por planta. Em relação às famílias 260 e 462, a mediana do número de nemátodes ($\tilde{x}_{260} = 227$; $\tilde{x}_{462} = 289$) é ligeiramente inferior quando comparado com as restantes, enquanto que para a família 486, o valor da mediana do número de nemátodes ($\tilde{x}_{486} = 1347$) é superior ao das outras famílias.

Das famílias em estudo, a 140 e 445 não apresentam valores *outliers*. Já as restantes dispõem de *outliers*, sendo o da família 486 o mais elevado (uma planta com 4816 nemátodes) seguido do da família 260 (uma planta com 2720 nemátodes), da família 462 (uma planta com 2176 nemátodes) e por fim, a família 480 (uma planta com 1760 nemátodes). Tendo em conta o valor inicialmente inoculado (500 nemátodes/planta), parece ter ocorrido um crescimento da população no interior da planta nas famílias 140 e 486.

O valor calculado da estatística do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($H_{calc} = 5.83$) não permitiu rejeitar a hipótese nula da distribuição do número de nemátodes por planta ser idêntica nas seis famílias, para qualquer nível de significância usual ($p - value = 0,3229$). Este resultado pode estar relacionado com a elevada variação verificada dentro de cada família.

De acordo com Boerma & Hussey (1992) a resistência pode ser avaliada através da capacidade de reprodução e desenvolvimento do NMP dentro da planta, já que a resistência de um hospedeiro a um agente patogénico significa a capacidade do hospedeiro em suprimir o desenvolvimento e reprodução desse agente. No entanto, sabendo-se que, em condições de temperatura favoráveis (aproximadamente 25°C), o *B. xylophilus* pode completar o seu ciclo de vida entre quatro a cinco dias e que uma fêmea no período de oviposição pode pôr entre 80 a 150 ovos (Penas, 2008), leva a concluir-se que, o número de nematodes vivos não deve ser considerada uma variável indicativa do grau de resistência do hospedeiro. Essa resistência deve, pois, ser avaliada considerando o número total de nematodes, não só os vivos como também os mortos encontrados no momento da morte da planta. A avaliação deste número total pode ser feita recorrendo a técnicas de biologia molecular, nomeadamente com *PCR real time*.

As temperaturas médias do ar registadas dentro da estufa até aos 38 DAI oscilaram entre e 24,2°C (setembro) e 22,7°C (outubro), valores estes favoráveis ao desenvolvimento do NMP.

4 CONCLUSÃO

A metodologia seguida neste trabalho permitiu a detecção de variabilidade genética em famílias de meios-irmãos de árvores selecionadas para a resistência/tolerância à Doença da Murchidão do Pinheiro, relativamente à sobrevivência após inoculação artificial com *B. xylophilus*. Concluiu-se, assim, que existe potencial para a aplicação das metodologias do melhoramento genético como forma de controlo da doença. Foi possível identificar famílias com maior percentagem de sobrevivência média e, desta forma, mais tolerantes/resistentes à Doença da Murchidão do Pinheiro. Verificou-se também que a maior sobrevivência está diretamente associada às variáveis altura total da planta e diâmetro na base do caule.

Este estudo encontra-se numa fase inicial sendo os resultados aqui apresentados preliminares. As famílias que revelaram maior sobrevivência deverão ser sujeitas a novos testes de inoculação de forma a confirmar os resultados obtidos e as plantas sobreviventes propagadas vegetativamente de forma a garantir o genótipo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, A., Carrasquinho, I., Alpuim, M., 2011. Melhoramento genético em pinheiro-bravo. *In*: Coelho, P. & Reis, P. (eds.), *Agrorrrural: Contributos Científicos*. INRB e INCM. Lisboa. Pp. 1013-1024.
- Akbulut, S. & Stamps, T. 2012. Insect vectors of the pinewood nematode: a review of theaul biology and ecology of *Monochamus* species. *Forest Pathology*, **42**: 89-99.
- Álvarez, G., Etxebeste, I., Gallego, D., David, G., Bonifácio, L., Jactel, H., Sousa, E., Pajares, J. A. 2014. Optimization of traps for live trapping of pine wood nematode vector *Monochamus galloprovincialis*. *Journal of Applied Entomology*, **139**: 618-626.
- Boerma, H. R. & Hussey, R. S. 1992. Breeding plants for resistance to nematodes. *Journal of Nematology*, **24**: 242-252.
- Bonifácio, L., Praias, F., Sousa, E. 2012. Trapping *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera:cerambycidae), vector of the pine wood nematode, with pine allelochemicals, in Portugal. *Silva Lusitana*, **20**: 39-53.
- Bonifácio, L., Naves, P., Sousa, E., 2013. Vetor-Planta hospedeira. *In* Sousa, E., Vale, F., Abrantes, I. (eds), *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa- Interações Biológicas e Gestão Integrada*. Federação Nacional das Associações de Proprietários Florestais. Lisboa. Pp. 125-156.
- Braasch, H., Burgermeister, W., Gu, J. 2009. Revised intra-generic grouping of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Aphelenchoididae). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, **12**: 65-88.
- Braasch, H. & Schönfeld, U. 2015. Improved morphological key to species of the xylophilus group of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *EPPO Bulletin*, **45**: 73-80.
- Costa, R., Ribeiro, P., Evaristo, I., Ribeiro, B., Aguiar, A., Carrasquinho, I., Santos, C., Vasconcelos, M. 2011. Are there any resistant trees of *Pinus pinaster* to *Bursaphelenchus xylophilus*? Studies implemented in Portugal to address this question. *BioMedCentral*, **5**: 80.
- Cram, M., Hanson, J. S/data. How to Identify and Manage Pine Wilt Disease and Treat Wood Products Infested by the Pinewood Nematodes. United States Department Agriculture.
- Disponível em: http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/howtos/ht_pinewilt/pinewilt.htm.
Acesso em: 16/1/2016
- Eriksson, G., Ekberg, I., Clapham, D. 2006. *An Introduction to Forest Genetics*. 2ª edição. Uppsala. Sweden.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization 2013. PM 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*. *EPPO Bulletin*, **43**: 105-118.
- Evans, H. F., McNamara, D. G., Braasch, H., Chadoeuf, J., Magnusson, C. 1996. Pest Risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bulletin*, **26**: 199-249.
- Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. 1996. *Introduction to quantitative Genetics*. 4ª edição. Prentice Hall. Malaysia.

- FFPRI. 2015. National Research and Development Agency from the Forestry and forest products research institute (FFPRI).
Disponível em: <http://www.ffpri.affrc.go.jp/en/pubs/documents/overview.pdf>. Acesso em: 10-11-2015.
- Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., Barrosol, J. G., Trindade, H., Sanches, J., Oliveira, C., Correia, M. 2014. *Pinus pinaster* Aiton e *Pinus pinea* L.. *Agrotec*, **12**: 14-18.
- Fonseca, L., Cardoso, J. M. S., Lopes, A., Pestana, M., Abreu, F., Nunes, N., Mota, M., Abrantes, I. 2012. The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Madeira Island. *Helminthologia*, **49**: 96-103.
- Fonseca, L., Cardoso, J., Abrantes, I., 2013. Nemátode- planta. In Sousa, E., Vale, F., Abrantes, I. (eds), *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa- interações Biológicas e Gestão Integrada*. Federação Nacional das Associações de Proprietários Florestais. Lisboa. Pp. 35-78.
- Furniss, R. L. 1950. Recommendations for forest insect in japan. *Nacional resources section*. (Cit. in Mota et al., 2009).
- Furniss, R. L. 1951. Forest insect control in Japan. s.l. *Nacional resources section*. Preliminary study, 45. (Cit. in Mota et al., 2009).
- Henderson, C. R. 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics*, **31**: 423-447.
- ICNF, 2013. 6º Inventário Florestal Nacional – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas.
Disponível em: <http://www.icnf.pt/portal/florestas/ifn/resource/ficheiros/ifn/ifn6-res-prelimv1-1>. Consultado em 7-10-2015
- ICNF, 2014. Plano de ação nacional para o controlo do nemátodo da madeira do pinheiro para o período de 2013-2017 - Rev. 2014. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas.
Disponível em: <http://www.icnf.pt/portal/florestas/prag-doe/agbn/nmp/resource/fich/pancnmp/planoNMP-2013-2017>. Consultado em: 7-10-2015
- Inácio, M. L., Nobrega, F., Vieira, P., Bonifácio, L., Naves, P., Sousa, E., Mota, M. 2015. First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *Forest Pathology*, **45**: 234-238.
- Kruskal, W. H. & Wallis, W. A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, **47**: 583-621.
- Kuramoto, T., Ohira, M., Hiraoka, Y., Taniguchi, T., Kashiwagi, M., Inoue, U., Hukuda, T., Saitou, S., Murayama, T., Ueda, M., Okamura, M., Hoshi, H., Fujisawa, Y. 2007. Genetic analysis of pine families resistance to pine wood nematode (in Japanese). *Trans Jpn For Soc* 118:O16. (Cit. in. Nose & Shiraishi, 2008)
- Kurinobu, S. 2008. Current staus of resistance breeding of Japanese pine species to pine wilt disease. *Forest Science and Technology*, **4**: 51-58.
- Kuroda, K. 1991. Mechanism of cavitation development in the pine wilt disease. *European. jornal for Forest Pathology*, **21**: 82-89.
- Littell R. C., Milliken G. A., Stroup W. W., Wolfinger R. D., Schabenberger O. 2006. *SAS System for Mixed Models*. 2ª edição. SAS Institute: Cary. North Carolina.
- Mamiya, Y. 1998. History of pine wilt disease in Japan. *Journal of Nematology*, **20**: 219-226.

- Mota, M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K., Sousa, E. 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, **1**: 727-734.
- Mota, M., Futai, K., Vieira, P., 2009. Pine wilt disease and the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. In Ciancio, A. & Mukerji, K. G. (Eds), *Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes*. Springer Science. Pp. 253-274.
- Naves, P. M., Sousa, E. M., Quartau, J. A. 2006. Feeding and oviposition preferences of *Monochamus galloprovincialis* for certain conifers under laboratory conditions. *Entomologia experimentalis et applicata*, **120**: 99-104.
- Naves, P. M., Camacho, S., Sousa, E. M., Quartau, J. A. 2007a. Transmission of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* through feeding activity of *Monochamus galloprovincialis* (col., Cerambycidae). *Journal of Applied Entomology*, **131**: 21-25.
- Naves, P. M., Sousa, E. M. & Quartau, J. A. 2007b. Winter dormancy of the pine sawyer *Monochamus galloprovincialis* (coleoptera, cerambycidae) in Portugal. *Journal of Applied Entomology*, **131**: 669-673.
- Naves, P., Sousa, E., Rodrigues, J. 2008. Biology of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) in the Pine Wilt Disease affected zone, southern Portugal. *Silva Lusitana*, **16**: 133-148.
- Naves, P. M. & Sousa, E. M. 2008. Life-history and seasonal development of *Monochamus galloprovincialis* (coleoptera, cerambycidae) in pine wilt disease affected zone in Portugal. *Silva Lusitania*, **6**: 133-148.
- Naves, P., Bonifácio, L., Sousa, E., 2013. Nemátode-vetor. In Sousa, E., Vale, F., Abrantes, I. (eds), *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa- Interações Biológicas e Gestão Integrada*. Federação Nacional das Associações de Proprietários Florestais. Lisboa. Pp. 81-122.
- Nose, M. & Shiraishi, S., 2008. Breeding for resistance to pine wilt disease. In Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R., Takeuchi, Y. (Eds), *Pine Wilt Disease*. Springer. Tokyo. Pp. 334-350.
- Ohba, K. 1979. Forest tree breeding in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly*, **13**: 138-144.
- Patterson H. D. & Thompson, R. 1971. Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. *Biometrika*, **58**: 545-554.
- Penas, A. C. 2008. *Morphobiometric and molecular characterization of Bursaphelenchus xylophilus Fuchs, 1937 (Nematoda: Aphelenchoididae) species associated with Pinus pinaster Aiton in Portugal*. Tese de Doutoramento. Universidade de Évora. Évora.
- Perry, D. H.; Hopkins, E.R. 1967. Importation of breeding material of *Pinus pinaster* Ait. from Portugal. *For. Dep. W.A. Bulletin*, No. 75. (Cit in. Aguiar et al. 2011).
- Ribeiro, B. 2012. *Variabilidade de resposta ao nemátode da madeira do pinheiro, Bursaphelenchus xylophilus, de plantas jovens de pinheiro bravo, Pinus pinaster, provenientes de uma população de melhoramento*. Tese de mestrado. Universidade de Evora, Instituto Superior de Agronomia. Universidade tecnica de Lisboa. Lisboa.
- Ribeiro, B., Espada, M., Vu, T., Nóbrega, F., Mota, M., Carrasquinho, I. 2012. Pine wilt disease: detection of the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) as a tool for a pine breeding programme. *Forest Pathology*, **42**:521-525.
- Robertson, L., Arcos, S. C., Escuer, M., Merino, R. S., Esparrago, G., Abelleira, A., Navas, A. 2011. Incidence of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* steiner & buhrer, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. *Nematology*, **13**: 755-757.

- Rodrigues, J. M., Sousa, E., Abrantes, I., 2013. Resenha histórica da doença da murchidão do pinheiro. In Sousa, E., Vale, F., Abrantes, I. (eds), *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa- Interações Biológicas e Gestão Integrada*. Federação Nacional das Associações de Proprietários Florestais. Lisboa. Pp. 13-32.
- Ryss, A., Vieira, P., Mota, M., Kulinich, O. 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs (Nematoda: Parasitaphelenchidae) with a key to species. *Nematology*, **7**:393-458.
- SAS Institute Inc. 2010. SAS/STAT® 9.2 User's Guide. SAS Institute Inc: Cary. North Carolina.
- Searle, S. R., Casella, G., McCulloch, C. E. 1992. *Variance Components*. John Wiley & Sons. New York.
- Self, S. G. & Liang, K. Y. 1987. Asymptotic properties of maximum likelihood estimators and likelihood ratio tests under nonstandard conditions. *Journal of the American Statistical Association*, **82**: 605-610.
- Shin, H., Lee, H., Woo, K., Noh, E., Koo, Y., Lee, K. 2009. Identification of genes upregulated by pinewood nematode inoculation in japanese red pine. *Tree Physiology*, **29**: 411-421.
- Siegel, S. 1975. *Estatística não-Paramétrica (Para as Ciências do Comportamento)*. McGraw-Hill. São Paulo.
- Snieszko, R. 2006. Resistance breeding against nonnative pathogens in forest trees – Current successes in North America. *Plant Pathology*, **28**: 270-279.
- Sousa, E., Bonifácio, L., Naves, P. 2008. *Current status on research and management of pine wilt disease in Portugal*. International symposium on pine wilt disease. Pp. 17-28.
- Sousa, E., Rodrigues, J. M., Bonifácio, L. F., Naves, P. M., Rodrigues, A., 2012. Management and control of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Portugal. In Boeri, F., Chung, J. A. (Eds), *Nematodes: Morphology, Functions and Management Strategies*. Nova Science Publishers. New York. Pp. 157-178.
- Sousa, E., Boifácio, L., Naves, P., Vieira, M., 2013. Gestão integrada da doença da murchidão do pinheiro. In Sousa, E., Vale, F., Abrantes, I. (eds), *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa- Interações Biológicas e Gestão Integrada*. Federação Nacional das Associações de Proprietários Florestais. Lisboa. Pp. 223-296.
- Stram, D. O. & Lee, J. W. 1994. Variance–components testing in the longitudinal mixed effects model. *Biometrics*, **50**: 1171-1177.
- Stroup, W. W. 2013. *Generalized Linear Mixed Models: Modern Concepts, Methods and Applications*. CRC Press. Boca Raton.
- Sutherland, J. R., 2008. A Brief Overview of the Pine Wood Nematode and Pine Wilt Disease in Canada and the United States. In Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R., Takeuchi, Y. (Eds), *Pine Wilt Disease*. Springer. Tokyo. Pp. 334-350.
- Telford, A., Cavers, S., Ennos, R. A., Cottrell, J. E. 2015. Can we protect forests by harnessing variation in resistance to pests and pathogens?. *Forestry*, **88**: 3-12.
- Toda, T. & Kurinobu, S., 1999. *Current status of resistance breeding of japanese pine species to pine wilt disease*. In: Sustainability of Pine Forests in Relation to Pine Wilt and Decline. Proceedings of International Symposium, Tokyo, Japan. 27-28 October, 1998-1999. Pp. 208-212.
- Toda, T. & Kurinobu, S. 1999. *Current status of resistance breeding of japanese pine species to pine wilt disease*. In: Sustainability of Pine Forests in Relation to Pine Wilt and Decline. Proceedings of International Symposium, Tokyo, Japan. 27-28 October, 1998-1999. Pp. 208-212.

- Toda, T. & Kurinobu, S. 2002. Realized genetic gains observed in progeny tolerance of selected Red pine (*Pinus densiflora*) and Black pine (*P. thunbergii*) to pine wilt disease. *Silvae Genetica*, **51**: 42-44.
- Tokushige, Y. & Kiyohara, T. 1969. *Bursaphelenchus* sp. in the wood of dead pine trees. *Journal of the Japanese Forest Society*, **51**:193-195. (Cit. in Mota et al., 2009).
- Tóth, A. 2011. *Bursaphelenchus xylophilus*, the pinewood nematode: its significance and a historical review. *Acta Biologica Szegediensis*, **55**:213-217.
- Valadas, V., Laranjo, M., Barbosa, P., Espada, M., Mota, M., Oliveira, S. 2012. The pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Portugal: possible introductions and spread routes of a serious biological invasion revealed by molecular methods. *Nematology*, **14**: 899-911.
- Vasconcelos, T. & Duarte, I., 2013. Fatores Abióticos/Bióticos- Planta. In Sousa, E., Vale, F., Abrantes, I. (eds), *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa- Interações Biológicas e Gestão Integrada*. Federação Nacional das Associações de Proprietários Florestais. Lisboa. Pp. 195-220.
- Whitehead, A. G. & Hemming, J. R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology Journal*, **55**: 25-38.
- Zhao, L., Mota, M., Vieira, P., Butcher, R. A., Sun, J. 2014. Interspecific communication between pinewood nematode, its insect vector, and associated microbes. *Trends in Parasitology*, **30**: 299-308.
- Zobel, B. J. & Talbert, J. 1984. *Applied Forest Tree Improvement*. John Wiley & Sons. North Carolina State University.

6 Anexos

Anexo I: Distribuição das 96 famílias pelos quatro blocos, na estufa

Bloco 1			
278	447	97	146
438	256	229	166
408	144	160	460
357	445	343	77
33	176	70	281
439	140	157	448
476	31	298	449
84	486	231	149
407	191	282	339
446	332	262	17
440	181	48	483
39	185	464	167
152	488	311	480
361	465	421	315
383	155	538	106
462	161	358	50
151	373	413	276
403	409	180	137
300	49	248	417
450	310	16	272
367	414	163	230
174	165	203	371
168	234	94	260
131	235	145	238

Bloco 2			
94	449	332	488
235	373	84	185
367	238	166	439
343	50	16	131
152	276	315	413
480	174	163	229
203	191	144	462
77	450	106	176
31	33	49	146
483	145	298	486
48	371	421	70
460	282	311	408
440	403	280	140
538	414	231	248
282	155	446	465
161	149	165	409
256	17	180	310
272	151	383	39
157	407	448	97
445	168	417	160
438	476	181	361
234	137	167	357
278	230	300	447
281	339	464	358

Bloco 3			
343	248	161	367
310	371	332	70
311	166	17	131
417	39	165	137
462	483	445	407
94	272	106	256
16	315	460	260
155	373	48	278
538	300	339	152
408	476	464	77
185	167	440	409
235	447	403	144
298	421	181	413
238	383	140	489
191	230	358	145
276	450	151	149
480	160	262	414
234	361	203	146
231	357	168	449
282	174	180	439
50	163	438	465
97	229	49	157
281	486	84	446
33	31	176	448

Bloco 4			
447	17	300	256
421	483	413	414
97	272	16	235
383	332	464	417
230	460	149	465
450	440	157	448
238	140	248	144
160	310	439	155
408	339	146	367
361	151	538	161
357	231	39	445
174	281	358	168
163	315	462	181
229	84	446	449
486	203	137	49
282	70	176	371
476	50	185	278
31	131	409	260
298	407	106	373
166	262	145	191
94	480	488	276
234	152	438	77
165	33	343	180
311	403	48	167

Anexo II: Ordenação (Ord.) decrescente dos melhores preditores lineares não enviesados empíricos (EBLUP) dos efeitos da família para as variáveis altura (cm) e diâmetro (mm)

Ord.	Família	EBLUP Altura	Família	EBLUP Diâmetro	Ord.	Família	EBLUP Altura	Família	EBLUP Diâmetro	Ord.	Família	EBLUP Altura	Família	EBLUP Diâmetro
1	421	8,717	460	0,827	33	77	1,239	145	0,113	65	167	-1,576	276	-0,170
2	446	7,506	446	0,684	34	180	1,217	464	0,109	66	185	-1,689	439	-0,176
3	460	7,261	421	0,628	35	157	0,943	229	0,105	67	361	-1,704	231	-0,180
4	174	6,961	94	0,576	36	448	0,822	417	0,103	68	165	-1,731	203	-0,182
5	465	6,860	174	0,542	37	445	0,709	181	0,090	69	17	-1,887	361	-0,195
6	94	6,745	310	0,502	38	464	0,709	408	0,082	70	403	-1,938	137	-0,199
7	447	6,322	371	0,500	39	413	0,659	149	0,078	71	145	-2,020	486	-0,201
8	310	6,295	248	0,436	40	462	0,489	176	0,066	72	298	-2,048	315	-0,205
9	248	6,202	161	0,416	41	50	0,429	168	0,064	73	97	-2,298	445	-0,205
10	414	6,105	414	0,407	42	234	0,350	131	0,054	74	166	-2,490	339	-0,217
11	371	5,106	16	0,357	43	407	0,334	440	0,018	75	332	-2,525	166	-0,235
12	152	4,952	465	0,355	44	438	0,325	234	0,014	76	163	-2,538	403	-0,239
13	161	4,711	235	0,345	45	160	0,283	167	0,000	77	176	-2,560	230	-0,251
14	358	3,762	260	0,333	46	151	0,186	185	-0,008	78	31	-2,600	462	-0,253
15	168	3,511	238	0,265	47	449	0,100	488	-0,016	79	235	-2,615	84	-0,259
16	282	3,357	300	0,261	48	417	0,012	155	-0,028	80	483	-2,887	17	-0,263
17	439	3,041	409	0,255	49	440	-0,187	450	-0,044	81	276	-3,054	278	-0,275
18	16	2,966	447	0,255	50	357	-0,204	157	-0,048	82	230	-3,085	97	-0,277
19	409	2,734	160	0,237	51	486	-0,409	480	-0,056	83	131	-3,143	48	-0,283
20	191	2,679	256	0,233	52	238	-0,418	332	-0,062	84	106	-3,154	538	-0,295
21	181	2,635	407	0,233	53	315	-0,650	106	-0,068	85	137	-3,284	144	-0,315
22	488	2,518	358	0,205	54	260	-0,665	50	-0,068	86	281	-3,747	146	-0,321
23	203	2,291	70	0,203	55	300	-0,842	413	-0,084	87	231	-3,944	311	-0,341
24	70	2,196	152	0,173	56	480	-0,873	281	-0,088	88	229	-4,182	151	-0,345
25	367	2,040	49	0,165	57	146	-0,990	272	-0,090	89	339	-5,027	367	-0,357
26	84	2,013	282	0,161	58	272	-1,069	77	-0,092	90	311	-5,651	438	-0,363
27	262	1,982	180	0,159	59	538	-1,181	383	-0,100	91	144	-6,200	163	-0,389
28	450	1,790	191	0,151	60	476	-1,248	262	-0,102	92	343	-8,270	449	-0,417
29	155	1,512	140	0,149	61	49	-1,298	373	-0,134	93	33	-8,338	39	-0,425
30	149	1,378	357	0,141	62	140	-1,327	298	-0,150	94	39	-8,587	165	-0,552
31	256	1,292	483	0,129	63	408	-1,466	31	-0,154	95	48	-9,011	343	-0,646
32	373	1,261	448	0,115	64	383	-1,497	476	-0,168	96	278	-9,401	33	-0,702

Anexo III: Ordenação dos melhores preditores lineares não enviesados empíricos (EBLUPS) dos efeitos da família relativamente à sobrevivência (escala *logit*), para as quatro avaliações realizadas após a inoculação.

Ordenação	27 DAI		38 DAI		56 DAI		157 DAI	
	Família	EBLUP	Família	EBLUP	Família	EBLUP	Família	EBLUP
1	176	0,621	152	0,700	152	0,937	152	0,903
2	165	0,569	77	0,587	146	0,863	77	0,871
3	77	0,544	146	0,552	77	0,814	282	0,638
4	152	0,543	176	0,499	165	0,671	146	0,563
5	146	0,543	165	0,477	84	0,600	276	0,494
6	262	0,532	180	0,446	358	0,513	17	0,485
7	462	0,515	31	0,382	480	0,503	144	0,431
8	446	0,469	480	0,379	31	0,503	50	0,397
9	180	0,457	421	0,363	276	0,470	181	0,382
10	421	0,440	276	0,358	462	0,442	447	0,365
11	229	0,439	50	0,338	180	0,423	260	0,344
12	31	0,419	84	0,326	17	0,418	358	0,343
13	50	0,404	17	0,301	176	0,389	440	0,343
14	282	0,400	358	0,289	282	0,375	332	0,343
15	231	0,384	97	0,246	33	0,369	538	0,339
16	161	0,354	538	0,238	262	0,350	262	0,339
17	276	0,353	282	0,238	50	0,345	480	0,329
18	39	0,353	234	0,230	538	0,338	106	0,321
19	361	0,326	450	0,228	311	0,334	448	0,318
20	185	0,308	281	0,194	234	0,318	311	0,309
21	151	0,297	33	0,192	151	0,310	234	0,307
22	97	0,274	462	0,184	185	0,168	180	0,302
23	17	0,266	161	0,179	161	0,168	176	0,213
24	181	0,263	262	0,174	414	0,165	157	0,195
25	298	0,261	403	0,173	421	0,157	163	0,174
26	403	0,260	151	0,173	163	0,125	185	0,167
27	310	0,234	229	0,163	281	0,119	272	0,153
28	137	0,226	230	0,155	413	0,106	383	0,147
29	448	0,223	332	0,147	438	0,105	165	0,147
30	339	0,213	438	0,143	447	0,096	413	0,145
31	33	0,191	185	0,129	260	0,095	421	0,139
32	234	0,185	231	0,119	450	0,086	229	0,137
33	311	0,184	39	0,114	230	0,085	414	0,135
34	238	0,177	144	0,103	332	0,067	462	0,116
35	281	0,161	311	0,102	231	0,065	357	0,115
36	480	0,153	49	0,094	235	0,060	203	0,110
37	414	0,151	357	0,088	97	0,047	155	0,107
38	315	0,151	383	0,082	168	0,045	486	0,101
39	155	0,144	465	0,076	181	0,042	70	0,099
40	49	0,143	203	0,061	448	0,041	465	0,097
41	94	0,139	413	0,059	155	0,035	408	0,072
42	203	0,139	440	0,047	339	0,033	161	0,069
43	332	0,130	361	0,038	357	0,032	230	0,065
44	48	0,104	70	0,023	106	0,026	231	0,028
45	538	0,100	163	0,019	486	0,015	300	0,019
46	230	0,097	414	0,012	440	-0,014	281	0,001
47	373	0,092	155	0,008	191	-0,021	191	-0,013
48	84	0,083	373	0,000	39	-0,024	403	-0,018
49	358	0,083	417	0,000	310	-0,025	361	-0,045
50	409	0,047	272	-0,017	229	-0,025	33	-0,048
51	235	0,021	447	-0,025	408	-0,027	446	-0,049
52	371	0,020	106	-0,033	70	-0,033	343	-0,064
53	272	0,017	486	-0,035	203	-0,041	371	-0,087
54	168	0,009	448	-0,041	373	-0,052	39	-0,111
55	166	0,006	235	-0,051	272	-0,057	315	-0,115

Anexo III: (continuação)

Ordenação	27 DAI		38 DAI		56 DAI		157 DAI	
	Família	EBLUP	Família	EBLUP	Família	EBLUP	Família	EBLUP
56	488	-0,018	446	-0,052	144	-0,062	373	-0,118
57	167	-0,024	300	-0,052	417	-0,079	407	-0,128
58	413	-0,034	339	-0,053	300	-0,083	367	-0,132
59	157	-0,040	181	-0,054	446	-0,090	151	-0,139
60	486	-0,053	94	-0,056	49	-0,093	483	-0,144
61	16	-0,062	191	-0,065	383	-0,097	310	-0,151
62	300	-0,068	137	-0,071	465	-0,100	248	-0,152
63	450	-0,076	408	-0,076	403	-0,101	97	-0,158
64	417	-0,087	310	-0,101	278	-0,155	174	-0,175
65	145	-0,091	464	-0,101	361	-0,160	409	-0,185
66	70	-0,094	168	-0,120	160	-0,170	445	-0,194
67	357	-0,096	371	-0,151	166	-0,193	168	-0,200
68	144	-0,097	160	-0,153	315	-0,206	31	-0,202
69	383	-0,099	488	-0,158	483	-0,210	417	-0,203
70	449	-0,123	278	-0,159	371	-0,222	439	-0,208
71	106	-0,168	260	-0,160	48	-0,249	449	-0,210
72	465	-0,172	238	-0,181	94	-0,252	167	-0,237
73	160	-0,186	367	-0,186	16	-0,257	450	-0,240
74	440	-0,257	315	-0,189	174	-0,284	84	-0,243
75	163	-0,264	145	-0,232	137	-0,290	339	-0,263
76	260	-0,289	298	-0,248	407	-0,296	298	-0,268
77	343	-0,308	256	-0,254	464	-0,299	464	-0,277
78	191	-0,312	483	-0,259	157	-0,299	145	-0,282
79	476	-0,326	48	-0,259	238	-0,300	16	-0,288
80	447	-0,351	166	-0,264	343	-0,307	438	-0,307
81	408	-0,351	174	-0,270	167	-0,308	48	-0,314
82	464	-0,365	409	-0,271	367	-0,309	137	-0,333
83	438	-0,372	16	-0,292	449	-0,338	160	-0,334
84	278	-0,453	157	-0,294	256	-0,344	166	-0,337
85	256	-0,518	343	-0,304	248	-0,379	149	-0,344
86	483	-0,521	449	-0,318	298	-0,401	476	-0,361
87	407	-0,545	167	-0,343	488	-0,409	488	-0,389
88	367	-0,545	439	-0,357	439	-0,416	238	-0,394
89	149	-0,549	149	-0,384	409	-0,439	278	-0,396
90	174	-0,677	407	-0,404	445	-0,447	256	-0,397
91	439	-0,712	476	-0,447	145	-0,476	94	-0,434
92	460	-0,829	248	-0,463	149	-0,480	49	-0,447
93	140	-0,900	445	-0,490	140	-0,533	131	-0,485
94	445	-0,942	460	-0,510	476	-0,550	235	-0,495
95	131	-1,102	140	-0,563	460	-0,625	140	-0,508
96	248	-1,142	131	-0,663	131	-0,648	460	-0,596

Anexo IV: Ordenação da percentagem de sobrevivência estimada ($\hat{\pi}_j$) para as quatro avaliações realizadas após a inoculação.

Ordenação	27 DAI		38 DAI		56 DAI		157 DAI	
	Família	$\hat{\pi}_j$ (%)	Família	$\hat{\pi}_j$ (%)	Família	$\hat{\pi}_j$ (%)	Família	$\hat{\pi}_j$ (%)
1	421	94,5	152	68,1	152	53,8	152	25,2
2	446	94,2	421	66,2	77	46,1	282	20,7
3	152	93,2	77	61,4	358	43,5	77	20,7
4	161	92,3	180	60,5	146	43,5	421	19,6
5	310	92,1	176	59,0	421	42,0	260	18,3
6	262	91,7	358	58,3	180	40,2	447	18,0
7	282	91,7	161	58,2	282	39,5	446	17,4
8	94	91,6	146	57,4	480	38,7	358	16,7
9	77	91,6	446	56,5	84	38,5	414	16,4
10	414	91,5	282	56,5	414	38,5	181	16,1
11	180	91,0	465	56,1	161	38,5	161	15,7
12	176	90,6	480	55,7	176	37,6	180	15,6
13	462	90,3	50	55,3	31	37,1	448	15,4
14	181	90,1	94	55,0	446	36,7	465	15,2
15	50	90,0	414	54,7	276	36,0	440	15,0
16	146	89,9	31	54,0	234	35,6	371	14,6
17	371	89,7	84	53,9	165	35,5	276	14,5
18	165	89,6	450	53,4	310	35,5	50	14,2
19	358	89,0	234	53,4	50	35,1	174	14,2
20	448	88,9	276	53,0	262	35,0	248	13,9
21	465	88,8	165	52,9	462	34,9	234	13,9
22	203	88,3	310	52,9	260	34,9	310	13,9
23	168	88,2	447	52,4	447	34,8	106	13,7
24	155	88,2	262	51,7	235	33,9	176	13,6
25	31	88,1	17	51,3	17	33,7	70	13,6
26	151	88,0	371	51,0	465	31,9	480	13,6
27	229	87,9	70	51,0	538	31,9	146	13,5
28	185	87,8	357	50,8	185	31,8	262	13,4
29	238	87,8	49	50,6	94	31,5	332	13,3
30	409	87,7	229	50,3	357	31,1	357	13,3
31	234	87,7	538	49,8	371	30,9	300	13,0
32	361	87,6	462	49,7	448	30,9	229	13,0
33	16	87,4	185	49,6	181	30,9	17	12,9
34	84	87,3	97	49,6	168	30,8	185	12,6
35	276	87,3	174	49,4	151	30,7	408	12,3
36	373	87,2	281	49,4	70	30,6	157	12,2
37	231	86,9	332	49,1	174	30,4	144	12,1
38	488	86,9	440	48,6	191	30,4	460	12,0
39	403	86,8	191	48,5	311	30,3	407	11,9
40	298	86,8	151	48,3	450	30,0	191	11,9
41	17	86,7	403	48,3	300	29,9	155	11,8
42	97	86,6	417	48,3	413	29,6	538	11,7
43	49	86,6	413	48,3	281	29,4	94	11,3
44	315	86,5	203	48,2	155	29,3	413	11,2
45	480	86,4	181	48,2	408	28,9	383	11,2
46	70	86,2	300	48,2	229	28,8	272	11,1
47	447	86,0	235	48,1	332	28,7	409	11,0
48	450	85,9	155	48,1	440	28,6	16	10,9
49	137	85,5	448	47,9	49	28,4	311	10,5
50	157	85,5	383	47,6	160	28,2	483	10,4
51	538	85,4	438	47,5	16	28,2	486	10,2
52	413	85,4	230	47,2	417	28,2	203	10,1
53	332	85,0	168	46,8	106	27,8	281	10,0
54	272	84,8	373	46,7	248	27,2	462	10,0
55	235	84,7	231	46,6	231	27,1	160	9,9
56	281	84,7	460	46,4	460	27,0	417	9,6

Anexo IV: (continuação)

Ordenação	27 DAI		38 DAI		56 DAI		157 DAI	
	Família	$\bar{\pi}_j$ (%)	Família	$\bar{\pi}_j$ (%)	Família	$\bar{\pi}_j$ (%)	Família	$\bar{\pi}_j$ (%)
57	357	84,5	260	46,3	230	26,7	231	9,6
58	417	84,4	464	46,2	486	26,4	168	9,6
59	300	84,2	160	46,1	438	26,3	163	9,1
60	339	84,0	361	45,6	33	26,3	256	9,1
61	486	84,0	408	45,5	272	26,1	145	9,1
62	160	84,0	272	45,5	339	26,0	238	9,1
63	191	83,9	238	45,2	373	26,0	230	9,1
64	230	83,8	16	45,1	163	25,9	464	9,0
65	167	83,6	488	44,5	203	25,8	361	9,0
66	174	83,4	409	44,5	97	25,8	235	8,9
67	166	83,3	486	44,4	238	25,7	403	8,6
68	449	83,2	106	44,3	483	25,7	450	8,5
69	383	82,9	256	44,0	407	25,7	167	8,4
70	145	82,8	311	43,7	383	25,2	373	8,4
71	311	82,7	144	43,7	256	24,9	149	8,3
72	39	82,3	248	43,4	464	24,0	315	8,3
73	460	82,0	163	42,8	403	23,6	49	8,2
74	260	81,9	137	42,0	409	23,4	439	8,0
75	440	81,5	39	41,7	361	23,1	31	7,9
76	464	81,2	145	41,7	144	22,9	165	7,9
77	106	80,4	339	41,5	167	22,6	445	7,8
78	256	79,8	33	41,1	157	22,4	140	7,4
79	438	79,6	483	40,8	315	22,3	488	7,3
80	408	79,4	315	40,5	39	22,1	97	7,3
81	33	79,3	367	40,4	166	22,0	298	7,2
82	476	79,1	157	40,2	278	21,3	339	7,2
83	48	78,7	407	40,0	488	21,1	131	7,1
84	149	78,5	149	39,4	149	20,8	151	7,0
85	367	78,5	298	38,8	145	20,8	367	6,9
86	407	78,4	439	38,6	137	20,5	476	6,9
87	163	78,3	167	38,2	140	20,2	84	6,9
88	144	77,9	166	37,6	48	19,8	39	6,6
89	439	77,2	278	36,3	439	19,6	166	6,6
90	483	74,8	449	35,9	298	19,3	137	6,5
91	248	74,2	140	34,6	367	19,2	449	6,4
92	343	70,5	476	34,6	445	18,5	48	6,2
93	445	70,1	48	34,1	449	18,1	438	6,1
94	140	69,5	445	34,1	131	17,4	343	5,9
95	278	67,3	131	30,8	476	17,2	278	5,8
96	131	62,0	343	30,4	343	15,9	33	5,7